



Türk Fındığı Posasının Fonksiyonel Gıdalarda Kullanımının İncelenmesi

Program Kodu: 1001

Proje No: 217O063

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Bursiyerler:
Ahmet Furkan ÇAĞLAR
Ayşe Gülden GÖKSU

MART 2021
İSTANBUL



ÖNSÖZ

Ülkemiz tarımsal çeşitlilik anlamında dikkati çekecek bir zenginliğe sahiptir. Birçok ürünün global üretim kapasitesi bağlamında ülkemizin kayda değer bir rekolteye sahip olduğu bilinmektedir.

Söz konusu ürünlerden bir tanesi fındıktır (*Corylus avellana* L.). Ülkemiz fındık üretiminde geleneksel olarak dünya çapında ilk sıradadır. Bununla birlikte diğer üretici ülkelerin fındık ile ilgili çalışma alanlarına yatırım yaptığı, kapasite ve kalite arttırdıkları günümüzde net olarak bilinmektedir. Dolayısıyla bu değerli kaynağın gereği gibi işlenmesi, fındıktan yüksek katma değerli ürünlerin üretilmesi, fındık ham maddelerinden üretilen katma değerlerin öncelikle ülkemizde kalması milli ekonomimiz açısından önemlidir. Bu alanda rekabetçi araştırmalara ihtiyacımız bulunmaktadır.

Bu projede, söz konusu amaç ve hedefler göz önüne alınarak değeri nispeten takdir edilememiş bir fındık ham maddesi olan fındık posasından biyoaktif özellikleri bulunan ve alerjenik özellikleri kısmen ya da tamamen baskılanmış protein hidrolizatları üretilmesi incelenmiştir. Biyoaktif özellikleri doğrulanan peptit fraksiyonları ulusal bir firmamızın desteği ile fındık ürünleri üretiminde değerlendirilmiş ve bu peptitlerin varlığında ürünlerin biyoaktif özellikleri incelenmiştir.

Bu bağlamda, sektörde kendisine yer bulma potansiyeli olan yenilikçi ürün formülasyonları üretildiğini ve bu ürünlerle ilgili öğrendiklerimizin daha katma değerli uygulamalar için de ışık tuttuğunu düşünmekteyiz.

Mevcut proje, TÜBİTAK 1001 Programı tarafından desteklenmiştir (2017-2020). Proje yürütücüsünün danışmanlığında 2 tanesi resmi TÜBİTAK bursiyerleri olmak üzere 3 yüksek lisans öğrencisinin YL tezleri kısmen ya da tamamen projeden alınan destek ile yürütülmüştür. Bu bağlamda proje ekibi olarak TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.



İÇİNDEKİLER

Önsöz.....	i
Tablo listesi.....	vi
Şekil listesi.....	ix
Özet.....	xiii
Abstract.....	xiv
1.Giriş.....	1
2.Literatür özeti.....	3
2.1 Bitkisel kaynaklı gıda atıkları ve yan ürünlerinin değerlendirilmesi.....	3
2.2 Soğuk pres yöntemi ile yağ eldesi.....	5
2.3 Amino asitler.....	6
2.4 Peptitler.....	7
2.4.1 Biyoaktif peptitler.....	7
2.4.2 Proteolitik hidroliz ve enzim dışı yöntemler.....	8
2.4.3 Antihipertansif peptitler.....	10
2.4.4 Antidiyabetik peptitler.....	12
2.4.5 Antioksidatif peptitler.....	13
2.5 Protein ve peptitlerin saflaştırılmasında kullanılan kromatografik yöntemler.....	14
2.5.1 Afinite kromatografisi.....	15
2.5.2 Jel filtrasyon kromatografisi.....	15
2.5.3 İyon değişim kromatografisi.....	16
2.5.4 Hidrofobik etkileşim kromatografisi.....	17
2.5.5 Ters faz kromatografisi.....	18
2.6 Bitkisel proteinlerin genel özellikleri.....	18
2.6.1 Yağlı tohum proteinleri.....	22
2.6.2 Bitkisel proteinlerin ekstraksiyonu.....	23
2.7 Fındığın bileşimi.....	24
2.8 Fındık proteinleri.....	28
2.9 Çörek otunun bileşimi ve fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi.....	29
2.10 Çörek otu proteinleri.....	31
2.11 Projede fındık proteinlerinin hidrolizi amacıyla kullanılan enzimler.....	32

3. Gereç ve Yöntem.....	36
3.1 Materyaller.....	36
3.2 Metot.....	36
3.2.1 Bitkisel posanın kompozisyon analizi.....	36
3.2.2 Bitkisel posalardan protein izolatlarının üretilmesi.....	38
3.2.3 Protein izolatlarının proteolitik hidrolizi.....	39
3.2.4 TNBS yöntemi ile hidroliz derecesinin belirlenmesi	40
3.2.5 Peptitlerin fraksiyonlara ayrılması.....	41
3.2.6 ACE-önleyici aktivite testleri.....	43
3.2.7 DPP-IV önleyici aktivite testleri.....	44
3.2.8 Anti-oksidatif aktivite testleri.....	45
3.2.8.1 Demir şelasyon aktivitesi testi.....	45
3.2.8.2 Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi.....	45
3.2.8.3 Superoksit anyon tutma aktivitesi testi.....	46
3.2.9 Asetilkolinesteraz (AChE) önleyici aktivite testi.....	46
3.2.10 Fraksiyonlanmış peptitlerin DPPH radikali tutma aktivitesi testi.....	47
3.2.11 Peptitlerin tanımlanması.....	47
3.2.12 ACE ve DPP-IV aktif fraksiyonların özelliklerinin değerlendirilmesi.....	48
3.2.13. Gıda uygulamaları ve ürün analizleri (FİSKOBİRLİK tesisleri).....	49
3.2.13.1 Kakaolu fındık kreması üretimi.....	50
3.2.13.2 Fındık ezmesi üretimi.....	55
3.2.13.3 Ürün analizleri.....	61
3.2.14. Ürünlerin alerjenisite testleri.....	64
3.2.15. Bitmiş ürünlerin simüle edilmiş gastrointestinal sindirim testleri.....	65
3.2.16. Ürünlerin biyoaktivite testleri.....	67
3.2.14. İstatistiksel analiz.....	67
4. Bulgular ve Tartışma.....	68
4.1 Tripsin, kimotripsin ve termolizin ile ilgili çalışmalar.....	68
4.1.1 ACE-önleyici aktivite.....	68
4.1.1.1 Hidroliz derecesi.....	68
4.1.1.2 Peptit numunelerinin anyon değişimi yöntemi ile fraksiyonlanması..	69
4.1.1.3 ACE-önleyici aktivite.....	80
4.1.2 ACE aktif fraksiyonların LC-MS/MS analizi ve <i>in silico</i> yöntemlerle değerlendirilmesi.....	82
4.1.3 ACE-önleyici aktivite çalışmalarına ait sonuçların değerlendirilmesi.....	92
4.1.4 DPP-IV-önleyici aktivite.....	93
4.1.5 DPP-IV aktif fraksiyonların LC-MS/MS analizi ve <i>in silico</i> yöntemlerle	

değerlendirilmesi.....	96
4.1.6 Anti-oksidatif aktivite testleri.....	101
4.1.6.1 Demir şelasyon aktivitesi testi.....	101
4.1.6.2 Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi.....	102
4.1.6.3 Superoksit anyon tutma aktivitesi testi.....	103
4.2 Çörek otu ile ilgili çalışmalar.....	106
4.2.1 AChE-önleyici aktivite testi.....	107
4.2.2 Anti-oksidatif aktivite testleri.....	109
4.2.2.1 DPPH radikali tutma aktivitesi testi.....	109
4.2.2.2 Demir şelasyon aktivite testi.....	111
4.2.2.3 Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi.....	113
4.2.3 Çörek otu protein hidrolizatlarının fraksiyonlanması.....	115
4.2.4 Fraksiyonlanmış peptitlerin DPPH analizi.....	116
4.2.5 LC-MS/MS Analizi.....	118
4.2.6 <i>In silico</i> analizler.....	122
4.3 Fındık proteinlerinin pepsin, bromelain ve papain ile ilgili çalışmalar.....	129
4.3.1 ACE-önleyici aktivite testi.....	129
4.3.2 DPP-IV-önleyici aktivite testi.....	143
4.3.3 Antioksidatif aktivite testleri.....	150
4.3.3.1 DPPH testi.....	150
4.3.3.2 Demir şelasyon aktivitesi testi.....	152
4.3.3.3 FRAP yöntemi.....	157
4.3.3.4 Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi.....	160
4.3.3.5 ABTS yöntemi.....	162
4.3.3.6 Superoksit anyon tutma aktivitesi testi.....	164
4.3.4 ACE-aktif fraksiyonların LC-MS/MS analizi ve özelliklerinin değerlendirilmesi.....	167
4.3.5 Gıda uygulamaları ve ürün analizleri.....	179
4.3.5.1 Ürünlerin fabrika analizleri.....	179
4.3.5.2 Ürünlerin alerjenisite testleri.....	181
4.3.5.3 Ürünlerin biyoaktivite testleri.....	181
4.4 Proje hedeflerine ulaşma durumunun değerlendirilmesi	189
5. Sonuç.....	191

Kaynaklar Listesi ve Atıflar.....	196
EKLER.....	217

TABLO ve ŞEKİL LİSTELERİ

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. İyon değişim ligandları ve fonksiyonel grupları (Konak vd., 2014).....	17
Tablo 2. Türkiye'nin 2017 fındık ihracatı rakamları (TİM, 2018).).....	26
Tablo 3. Türkiye'de yetiştirilen farklı fındık çeşitlerine ait nem, yağ, kül, protein miktarları (% g/g cinsinden) (Köksal vd., 2016)	27
Tablo 4. Fındık küspesi ve fındık protein izolatları için nem, kül, protein içeriği (% g/g). Değerler, en az 2 bağımsız ölçümün ortalamasını vermektedir. Standard sapma değerleri bütün durumlarda ortalama değer %5'inden küçüktür	38
Tablo 5. Her bir hidrolizat için en etkin (PeptideRanker değerine göre) peptid sekansları.....	87
Tablo 6. SPLAGR peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.	91
Tablo 7. VPHW peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.	91
Tablo 8. PGHF peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.	91
Tablo 9. Mevcut peptitlerin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi ve bu listelerin VPP peptidine ait liste ile kıyaslanması.	92
Tablo 10. YDLDFK peptidinin DPP-IV ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.	99
Tablo 11. Papain ve tripsin enzimleri ile elde edilen hidrolizatlardan, antioksidatif testler ve asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyon testlerinde elde edilen en yüksek (%) inhibisyon sonuçlarını ortaya çıkaran koşullar.....	106
Tablo 12. LC/MS-MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PA fraksiyonunun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi..	123
Tablo 13. LC/MS-MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PA fraksiyonunun biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.....	123
Tablo 14. LC/MS-MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PB fraksiyonunun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	124
Tablo 15. LC/MS-MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PB fraksiyonunun biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.....	124

Tablo 16. LC/MS-MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PC fraksiyonunun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	125
Tablo 17. LC/MS-MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PC fraksiyonunun biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.....	126
Tablo 18. YDLDFK peptidinin AChE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.....	128
Tablo 19. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	130
Tablo 20. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %ACE aktivitesi değerleri.....	132
Tablo 21. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	134
Tablo 22. Kaptoprile ait ortalama %ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	135
Tablo 23. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPP4 inhibisyon aktivitesi değerleri.....	144
Tablo 24. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPP4 inhibisyon aktivitesi değerleri.....	146
Tablo 25. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPP4 inhibisyon aktivitesi değerleri.....	147
Tablo 26. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % DPPH süpürme aktivitesi değerleri.....	150
Tablo 27. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPPH süpürme aktivitesi değerleri.....	151
Tablo 28. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPP4 inhibisyon aktivitesi değerleri.....	152
Tablo 29. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri.....	153
Tablo 30. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri.....	154
Tablo 31. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri.....	156
Tablo 32. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama demir şelasyon aktivitesi değerleri.....	158
Tablo 33. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %demir şelasyon aktivitesi değerleri.....	158
Tablo 34. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %demir şelasyon aktivitesi değerleri.....	159
Tablo 35. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri.....	160
Tablo 36. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri.....	161
Tablo 37. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri.....	161
Tablo 38. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ABTS süpürme aktivitesi değerleri.....	162
Tablo 39. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait % ABTS süpürme aktivitesi değerleri.....	163
Tablo 40. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama ABTS süpürme aktivitesi değerleri.....	163
Tablo 41. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri.....	164
Tablo 42. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait % superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri.....	165

Tablo 43. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri.....	166
Tablo 44. LC/MS-MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda peptik ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristیکlerinin belirlenmesi.....	169
Tablo 45. LC/MS-MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda papain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristیکlerinin belirlenmesi.....	171
Tablo 46. LC/MS-MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda bromelain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristیکlerinin belirlenmesi.....	172
Tablo 47. FFFPGPNK peptitinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.....	175
Tablo 48. SEGFVAVAFK peptitinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.....	176
Tablo 49. FMRWRDRFL peptitinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.....	178
Tablo 50. Mevcut peptitlerin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi ve bu listelerin VPP peptidine ait liste ile kıyaslanması.....	178
Tablo 51. Mikrobiyolojik analiz sonuçları.....	180
Tablo 52. Alerjen testi örnekleri ve numunelerde belirlenen alerjen madde miktarı (mg/kg).....	181
Tablo 53. Ürünlerin %ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	182
Tablo 54. Ürünlerin %DPP4 inhibisyon aktivitesi değerleri.....	183
Tablo 55. Ürünlerin %DPPH süpürme aktivitesi değerleri.....	184
Tablo 56. Ürünlerin %demir şelasyon aktivitesi değerleri.....	185
Tablo 57. Ürünlerin %demir (III) iyonu indirgeyici aktivite değerleri.....	186
Tablo 58. Ürünlerin %hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri.....	187
Tablo 59. Ürünlerin %superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri.....	188

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Numunelerin nem tayinine tabi tutulması.....	36
Şekil 2. Numunelerin kül tayinine tabi tutulması.....	37
Şekil 3. Desikatöre soğuması için alınan örnekler.....	37
Şekil 4. Protein izolatlarının liyofilizasyonu.....	39
Şekil 5. Liyofilize protein örneklerinin toz hale getirilerek -20°C’de saklanması.....	39
Şekil 6. FPLC akış yolu.....	42
Şekil 7. FPLC’de fraksiyonları için kurulan örnek metot.....	43
Şekil 8. Fiskobirlik denemelerinde kullanılan fraksiyonların liyofilize edilmesi.....	43
Şekil 9. %16 Nuga (Kakaolu Fındık Kreması) üretim akış şeması.....	54
Şekil 10. Manuel konçlama esnasında ürünün fiziksel ve tekstürel değişimi	55
Şekil 11. %70 fındık ezmesi üretim akış şeması.....	61
Şekil 12. Hızlı nem tayin cihazı.....	62
Şekil 13. Pres aleti ve Gerhart Soxhlet yağ tayin cihazı	63
Şekil 14. Aflatoksin analizinde kullanılan HPLC sistemi.....	64
Şekil 15. Ürünlerin sindirim testlerinin yapılması.....	66
Şekil 16. Sindirilmiş ürünlerin kaba filtreden geçirilmesi.....	66
Şekil 17. Sindirilmiş ürünlerin kaba filtreden sonra santrifüj edilmesi.....	67
Şekil 18. Ürünlerin sindirim öncesi ve sindirim sonrası görünümü.....	67
Şekil 19. TNBS yöntemiyle belirlenen, çeşitli proteazlar tarafından hidrolize edilmiş fındık posası proteinlerinin hidroliz derecesi. Tripsinlizde referans örnek olarak sodyum kazeinat kullanılmıştır (n=3).....	68
Şekil 19. Hidrolizat örneklerinin 20 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak 1 ve 5 ml yatak hacimli Capto-Q anyon değişim kolonunda fraksiyonlanması (X: kolon hacmi-CV, Y: Absorbans- 280 nm). (A, B) Kimotripsin hidrolizatlarının, (C, D) Termolisin hidrolizatlarının, (E, F) Tripsin hidrolizatlarının sırasıyla 1 ve 5 ml yatak hacimli kolonlarda 32 CV elüsyonu.....	71
Şekil 20. Hidrolizat örneklerinin 100 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak 5 ml yatak hacimli Capto-Q anyon değişim kolonunda fraksiyonlanması (X: kolon hacmi-CV, Y: Absorbans-280 nm). (A) Tripsin hidrolizatlarının 32 CV elüsyonu, (B) Kimotripsin hidrolizatlarının 32CV elüsyonu, (C) Termolisin hidrolizatlarının 32CV elüsyonu.....	77
Şekil 21. ACE testi HPLC kromatogramı (A) HA ve HHL bileşiklerine ait alıkonma kromatogramı, (B) HA molekülünün miktarına bağlı inhibisyon karşılaştırmasını içeren örnek kromatogram (X: zaman, Y: Absorbans-228 nm).....	80
Şekil 22. Çeşitli proteazlar tarafından hidrolize edilmiş fındık posası peptid fraksiyonları için ACE inhibisyon aktivitesi. Fraksiyonlama, (A) Capto Q, 1 ml veya (B) Capto Q, 5 ml yatak hacimli kolon kullanılarak yapıldı. ACE inhibisyon testlerinde Kaptopril referans inhibitör olarak kullanıldı. Fraksiyon adları, aşağıdaki gibi kullanılan enzime dayanmaktadır: C; Kimotripsin hidrolizatlarından elde edilen fraksiyonlar (C1,C2,C3,C4). E: Termolisin hidrolizatlarından elde edilen fraksiyonlar (E1,E2,E3,E4,E5,E6). T; Tripsin hidrolizatlarından elde edilen fraksiyonlar (T1,T2,T3,T4). C1(out), E1(out) ve T1(out) kolona bağlanmayan bileşikler içeren fraksiyonlardır.....	81
Şekil 23. C2 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum NLNAHSVY peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.....	84

- Şekil 24.** E2 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum EQYNREV peptitinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir...85
- Şekil 25.** T3 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum AEQFGQQHVTGSQGS peptitinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.....86
- Şekil 26.** Triptik peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan SPLAGR peptitinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Üstte enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, alttaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.....88
- Şekil 27.** Kimotriptik peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan VPHW peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Üstte enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, alttaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.....89
- Şekil 28.** Termolisin muamelesi ile hazırlanan peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan PGHF peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Üstte enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, alttaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.....90
- Şekil 29.** DPP-IV inhibisyonu karşılaştırması için örnek spektrum. Karşılaştırma için 405 nm’de absorbans değerleri esas alınmıştır. Referans inhibitör olarak Diprotin-A kullanılmıştır.....94
- Şekil 30.** Hidrolizat fraksiyonlarının % DPP-IV inhibisyonu (X: fraksiyon numarası, Y: %inhibisyon) (A) Tripsin hidrolizat fraksiyonları (B) Kimotripsin hidrolizat fraksiyonları (C) Termolisin hidrolizat fraksiyonları (Dip-A: referans inhibitör).....95
- Şekil 31.** C10 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum ANQLDENPRHFY peptitinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.....97
- Şekil 32.** C10 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum ANQLDENPRHFY peptitinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.....98
- Şekil 33.** DPP-IV inhibisyon parametreleri bulunan DPP-IV inhibitörü peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan YDLDFK peptitinin, DPP-IV ile etkileşiminin şematize edilmesi. Solda enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, sağdaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.....100
- Şekil 34.** Çeşitli proteazlar tarafından hidrolize edilmiş fındık hidrolizatlarının % şelatlanma kapasitesi. Hidrolizatlar %1 protein içerecek şekilde saf su içerisinde pH 8’e ayarlanarak hazırlanmış ve tripsin, kimotripsin ve termolisin proteazları kullanılmıştır. EDTA (100 µg/ml) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.....102
- Şekil 35.** Çeşitli proteazlar tarafından hidroliz edilmiş fındık peptit fraksiyonlarının hidroksil radikali tutma aktivitesi. Örnekler Capto-Q 5 ml yatak hacimli kolonda 20mM Tris-HCl (pH 8,3) tamponu kullanılarak 2 CV aralıklarla fraksiyonlanmış ve 17 fraksiyon toplanmıştır (F1-F17). BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.....103
- Şekil 36.** Çeşitli proteazlar tarafından hidroliz edilmiş fındık peptit fraksiyonlarının süperoksit anyon tutma aktivitesi. Örnekler Capto-Q 5 ml yatak hacimli kolonda 20 mM Tris-HCl (pH 8,3) tamponu kullanılarak 2 CV aralıklarla fraksiyonlanmış ve 17 fraksiyon toplanmıştır (F1-F17). BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.....104
- Şekil 37.** Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri AChE önleyici aktiviteleri.....108

Şekil 38. Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri DPPH inhibisyonu.	110
Şekil 39. Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri demir şelasyon aktiviteleri.	112
Şekil 40. Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri hidroksil radikali tutma aktiviteleri.	114
Şekil 41. Papain ile 30 dakika hidroliz edilmiş çörek otu protein ekstraktlarının HiTrap 1 ml Capto DEAE (zayıf anyonik) kolon ve 35 CV ile fraksiyonlanma ve elde edilen 4 (PA, PB, PC ve PD) fraksiyonun kromatogramı.....	116
Şekil 42. Çörek otu protein konsantrasyonunun (P), papain enzimi ile 30 dakikalık hidrolizi sonrası fraksiyonlanmış protein hidrolizatların (PA, PB, PC ve PD) ve bu hidrolizat konsantrasyonlarının hacmen iki katına çıkarılmış (2PA, 2PB, 2PC VE 2PD) örneklerinin DPPH inhibisyon aktiviteleri (standart sapma < % 5).....	117
Şekil 43. PA fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum NELLFAEIEYMQK peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.....	119
Şekil 44. PB fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum IDWKETPEAHVFK peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.....	120
Şekil 45. PC fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum ALIEQIK peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.....	121
Şekil 46. PB fraksiyonu peptitleri arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan YDLDFK peptidinin AChE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Solda enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, sağdaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme ("zoom") uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.....	127
Şekil 47. Negatif ve pozitif kontrole göre peptit fraksiyonu HA alanı.....	129
Şekil 48. Papain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının HA alanları..	130
Şekil 49. Papain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivite değerleri.....	131
Şekil 50. Bromelain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının HA alanları.....	131
Şekil 51. Bromelain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	133
Şekil 52. Pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının HA alanları..	133
Şekil 53. Pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	135
Şekil 54. Kaptopril (pozitif kontrol) için farklı konsantrasyonlardaki hippürik asit alanları.....	136
Şekil 55. Papain, bromelain, pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı out fraksiyonlarının HA alanları.....	137
Şekil 56. Papain, bromelain, pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatları ve negatif kontrolün HA alanları.....	137
Şekil 57. Papain, bromelain, pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatları ve fraksiyonlamadaki out kısmının %ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	138
Şekil 58. Pozitif kontrol Kaptopril için IC ₅₀ grafiği.....	139
Şekil 59. PAF8 fraksiyonu için IC ₅₀ grafiği.....	141
Şekil 60. PEF3 fraksiyonu için IC ₅₀ grafiği.....	141
Şekil 61. PEF6 fraksiyonu için IC ₅₀ grafiği.....	142
Şekil 62. BRF3 fraksiyonu için IC ₅₀ grafiği.....	142
Şekil 63. En yüksek ACE-önleyici aktiviteye sahip fraksiyonlar.	143
Şekil 64. Pozitif kontrol olan Diprotin A için IC ₅₀ grafiği.....	144

Şekil 65. Papain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % DPP4 inhibisyon aktivite değerleri.....	145
Şekil 66. Bromelain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % DPP4 inhibisyon aktivite değerleri.....	146
Şekil 67. Pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % DPP4 inhibisyon aktivite değerleri.....	148
Şekil 68. BRF9 fraksiyonu için IC ₅₀ grafiği.....	149
Şekil 69. PAF2 fraksiyonu için IC ₅₀ grafiği.....	149
Şekil 70. En yüksek DPP4-önleyici aktiviteye sahip fraksiyonlar.....	150
Şekil 71. Papain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % DPPH süpürme aktivitesi.....	154
Şekil 72. Bromelain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % DPPH süpürme aktivitesi.....	155
Şekil 73. Pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % DPPH süpürme aktivitesi.....	157
Şekil 74. Troloks ve fraksiyonlara ait %superoksit anyon tutma değerleri.....	167
Şekil 75. PAF-3 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum LGDYLLEQGL peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.....	167
Şekil 76. 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.....	174
Şekil 77. Papain muamelesi ile oluşturulan peptitler arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan kısa peptidin (≤ 10 amino asit, SEGFEWVAFK) 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.....	175
Şekil 78. 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.....	177
Şekil 79. Analiz edilen fındık örneğine ait kromatogram görüntüsü.....	180

Bu projede, soğuk pres yöntemi ile yağlı alınmış fındık posasından biyoaktif özellikleri bulunan ve alerjenik özellikleri kısmen ya da tamamen baskılanmış protein hidrolizatları üretilmesi amaçlanmıştır. Biyoaktif özellikleri doğrulanmış peptit fraksiyonları ulusal bir firmamızın (FİSKOBİRLİK) desteği ile endüstriyel fındık ürünleri üretiminde değerlendirilmiş ve bu peptitlerin varlığında ürünlerin biyoaktif özellikleri incelenmiştir.

Öncelikle uygun sulu ekstraksiyon (alkali çözündürme ve izoelektrik çökeltme) teknikleri ile protein izolatları üretilmiş (> %90 protein), sonraki aşamalarda 6 farklı proteaz (pepsin, tripsin, kimotripsin, termolizin, bromelain ve papain) kullanılarak enzimatik hidroliz ile bu fındık proteinlerinin parçalanması sağlanmış ve hidrolizatlarda bulunan peptitler biyoaktif özellikler açısından (antihipertansif, antioksidatif ve antidiyabetik özellikler) değerlendirilmiştir. Bu amaçla elde edilen protein hidrolizatları uygun FPLC yöntemleri (anyon değişimi) ile fraksiyonlara ayrılmıştır. Bu fraksiyonlardan biyoaktif özellikleri bulguların öncelikle LC-Q-TOF/MS yöntemleri ile dizilimler belirlenmiş ve uygun *in silico* yöntemler ile de biyoaktif özellikleri doğrulanmıştır. En etkin biyoaktif özellikleri olan hidrolizat fraksiyonları ulusal bir firmamızın (FİSKOBİRLİK) desteği ile fındık ürünleri üretiminde değerlendirilmiştir. Burada temel hedef, alerjenik özellikleri baskılanmış ve biyoaktif özellikleri korunmuş katma değerli, endüstriyel fındık ürünleri üretilmesidir. Endüstriyel koşullarda üretilen fındık ürünleri (fındık ezmesi ve kakaolu fındık kreması) yürütücü kuruluş laboratuvarlarında simüle edilmiş gastrointestinal sindirime tabi tutulmuştur. Sindirilen fraksiyonlar da yeniden biyoaktif özellikler açısından (özellikle *in vitro* antihipertansif aktivite) değerlendirilmiştir. Sindirim aşamasından sonra da peptit profili uygun HPLC teknikleri ile analiz edilmiştir.

Bu çalışmalara bağlı olarak öncelikle aktif olma potansiyeli bulunan yüzlerce peptit dizilimi belirlenmiştir. Bu peptitlerin bulunduğu fraksiyonların antihipertansif, antioksidatif ve antidiyabetik özellikleri değerlendirilmiş ve en etkili fraksiyonların bazıları endüstriyel denemelerde kullanılmıştır. Bu çalışmalara bağlı olarak fındık peptitlerinin biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesi yanında biyoaktif fındık peptitlerini içeren fraksiyonların gıda ürünlerinde kullanımı, katıldıkları ürünlerde peptitlerin stabilitesi ve sindirim sürecinde aktivitenin korunması ile ilgili değerlendirmelerde bulunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Fındık; biyoaktif peptitler; enzimatik hidroliz; antihipertansif aktivite; fındık ezmesi ve kakaolu fındık kreması.



ABSTRACT

In this project, it is aimed to produce protein hydrolysates with bioactive properties and partially or completely suppressed allergenic properties from the cold press hazelnut cakes. Peptide fractions, whose bioactive properties were confirmed, were utilized in the production of hazelnut products with the support of a national company (FİSKOBİRLİK) and the bioactive properties of the industrially prepared products were investigated in the presence of these peptides.

Firstly, protein isolates were produced (> 90% protein) with appropriate aqueous extraction (alkali extraction - isoelectric precipitation) techniques, and in the following stages, 6 different proteases (pepsin, trypsin, chymotrypsin, thermolysin, bromelain and papain) were used to break down the hazelnut proteins via enzymatic hydrolysis. The peptides present in the hydrolysates were evaluated for their bioactive properties (i.e., antihypertensive, antioxidative and antidiabetic properties). Protein hydrolysates obtained for this purpose were fractionated using appropriate FPLC methods (i.e., anion exchange). The sequences of those fractions which were shown to possess bioactive properties were determined by LC-Q-TOF/MS methods, and their bioactive properties were confirmed by appropriate *in silico* techniques. Hydrolyzate fractions, which have the most effective bioactive properties, have been exploited in the production of hazelnut products with the support of a national company (FİSKOBİRLİK). Here, the main goal was to produce value-added industrial hazelnut products with suppressed allergenic properties and preserved bioactive properties. Hazelnut products (hazelnut butter and cocoa hazelnut cream) produced under industrial conditions were subjected to simulated gastrointestinal digestion in our University laboratories. Digested fractions were also re-evaluated for bioactive properties (particularly *in vitro* antihypertensive activity). After the digestion step, the peptide profile was analyzed by appropriate HPLC techniques.

Based on these studies, hundreds of peptide sequences that have the potential to be bioactive have been determined. The antihypertensive, antioxidative and antidiabetic properties of the fractions containing these peptides were evaluated and some of the most effective fractions were used in industrial trials. Based on these studies, besides evaluating the bioactive properties of hazelnut peptides, the use of fractions containing bioactive hazelnut peptides in food products, the stability of these peptides in the products they are added to, and the preservation of activity in the digestive processes were evaluated.

Keywords: Hazelnut; bioactive peptides; enzymatic hydrolysis; antihypertensive activity; hazelnut butter and hazelnut cream with cocoa.



Sonuç Raporu Ana Metni

1. GİRİŞ

Artmakta olan dünya popülasyonu kaynakların doğru kullanılmasını gerektirmektedir. Nüfusun artmasına paralel olarak gıda, özellikle nitelikli gıda ürünü talepleri de artmaktadır. Gıdalara nitelik katan başlıca değerli bileşenlerin arasında protein mutlaka sayılmalıdır. Protein üretimi gerek doğal kaynakların kullanımı, gerekse de tüketiciye yansıyan maliyetler bağlamında maliyetli/pahalı bir prosestir. Özellikle hayvansal proteinlerin üretim maliyetlerinin yüksek olduğu hem üreticiler, hem de tüketiciler tarafından iyi bilinen bir gerçektir. Kaynakların kullanım etkinliği açısından, hayvansal proteinin maliyeti oldukça yüksektir. Yaklaşık olarak 100 g bitkisel protein kullanılarak beslenen besi hayvanlarından 15 g protein elde edildiği bilinmektedir. Önümüzdeki yıllarda bitkisel protein kaynaklarının artan bir yoğunlukla değerlendirilmesi beklenmektedir.

Bu verilere paralel olarak, dünyanın birçok ülkesinde bitkisel protein üretimine yönelik yatırımlar söz konusudur. Mevcut durumda bütün dünyada en yaygın olarak kullanılan bitkisel protein ürünleri soya bazlıdır. Bununla birlikte bezelye dâhil olmak üzere alternatif kaynaklara yönelik sürmektedir. Dini, felsefi vb yaklaşımlar da bitkisel proteinlerin cazibesini birçok ülke ve toplulukta arttırmaktadır. Mevcut durumda, global bitkisel protein üretimini gıda endüstrisi kolaylıkla kullanmakta ve genel popülasyonun kullanması için (evsel kullanım vs) çok fazla ürün geriye bırakmamaktadır. Dolayısıyla zaman içinde artan miktarlarda ve çeşitlilikte protein ürünlerinin de piyasaya çıkabileceği anlaşılmaktadır.

Protein hidrolizatlarının da global piyasa değeri günümüzde artış göstermektedir. Bu ürünlerin katılması gıda ürünlerinde ve diğer endüstriyel ürünlerde iyileşen dokusal özellikler, kıvam, çözünürlük ve köpük oluşumu gibi teknik özelliklere bağlıdır. Bununla birlikte "biyoaktif peptitler" olarak adlandırılan insan sağlığına olumlu fizyolojik katkılar sağlama potansiyeli olan peptitler ve bunları içeren hidrolizatlar da özellikle fonksiyonel gıdalar bağlamında karşılık bulabilmektedir.

Biyoaktif peptitler gıda ürünlerinde üretim süreçlerinin etkisiyle ya da mikrobiyal ya da enzimatik ajanların etkisi ile oluşabilmektedirler. Bu çalışmada enzimatik muamelelerin etkisi ile biyoaktif peptitlerin oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaca yönelik olarak ticari değeri nispeten düşük bir yan ürün olan fındık posası alınmış ve fındık protein izolatlarının üretiminde kullanılmıştır. Bu izolatlardaki proteinler enzimatik yöntemlerle parçalanarak bir dizi hidrolizat elde edilmiştir. Çalışma kapsamında modern



fraksiyonlama teknikleri ile fraksiyonlara ayrılan hidrolizatların biyoaktif özellikleri uygun *in vitro* testler ile incelenmiş ve bu aşamalarda biyoaktivite gösteren peptit/hidrolizat fraksiyonları sonraki proje çalışmalarına baz teşkil etmiştir.

Buna bağlı olarak biyoaktif fraksiyonların peptit dizilimleri belirlenmiş, bulunan dizilimlerin aktif özellikleri uygun simülasyon teknikleri ile doğrulanmış ve bu süreçler sonunda maksimum biyoaktivite gösteren fraksiyonlar gıda denemelerinde değerlendirilmiştir.

Bu aşamaya elde edilen bulgular, ekibimizin önceki çalışmalarında yürütülmüş olan simülasyonlar ile tutarlı sonuçlar vermiştir (Gülseren, 2018). Özellikle ACE-önleyici aktivitesi olan fraksiyonların değerlendirilmesi hususuna önem verilmiştir.

Ulusal bir firmamızın (FİSKOBİRLİK) desteği ile biyoaktif fındık peptitleri yine fındık ürünlerinin (fındık ezmesi ve kakaolu fındık kreması) içine konularak bu ürünlerdeki performansları incelenmiştir. Bu ürünlerde peptitlerin makul ölçüde kararlılık gösterdiği ve enzimatik parçalanmanın alerjenik özelliklerin kısmen ya da tamamen baskılanmasına sebep olduğu gözlenmiştir.

Mevcut veriler değerli bir kaynağımız olan fındığın fonksiyonel gıdalara yönelik olarak protein konsantre, izolat ve hidrolizat bileşenlerinin kullanımının birçok yeni kullanım alanı ortaya çıkarabileceğini, fındık yağı dışındaki bileşenlerin de (örneğin, protein) bu bağlamda değerlendirilebileceğini ve özellikle alerjenik özelliklerin baskılanmasına uygun yöntemlerle fındık ya da fındık bileşenlerini içeren endüstriyel ürünlerin global alanda önem kazanabileceğini düşündürmüştür. Ekibimiz sonraki çalışmalarında hem gıda üretiminde, hem de diğer sektörlerde katma değerli fındık ve protein bileşenlerinin katma değerlendirilmesi ile ilgili çalışmalarına devam edecektir. Projenin getirdiği donanım ve olanaklar sayesinde, proje yürütücüsünün 1 YL öğrencisi de benzer çalışmaları (gıda üretimi dışında) çörek otu proteinleri ve peptitleri alanında yürütmüştür. Bu çalışmalar ile ilgili bulgular da mevcut rapor kapsamında bilgilerinize sunulmaktadır. Bu bağlamda projede 2 tanesi resmi TÜBİTAK bursiyerleri olmak üzere 3 farklı YL öğrencisi tezlerini tamamlamıştır. Ayrıca bölümümüzün laboratuvar koordinatörü Bilal Çakır (MS, Biyokimya) bu alandaki tecrübelerini arttırma olanağı bulmuştur.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Bitkisel Kaynaklı Gıda Atıkları ve Yan Ürünlerinin Değerlendirilmesi

Gıda işleme prosesleri sonucunda, büyük bir kısmı çevre kirliliğine neden olan ya da ekonomik değeri az olan hayvan yemi ve gübre gibi ürünlere dönüştürülen büyük miktarlarda atık ve yan ürünler oluşmaktadır (Yağcı vd., 2006). Dünya genelinde her yıl insan tüketimi için üretilen gıdaların üçte biri atık olarak harcanmaktadır (Pleissner ve Kin, 2013). Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından 2013 yılında yapılan araştırmaya göre atılan gıda miktarı 1.3 milyon ton olarak belirlenmiştir (Topkaya, 2017). Bu miktarın içerisine tahıllar, kökler, yağlı tohumlar, bakliyatlar, meyve ve sebzeler, et, deniz ürünleri, süt ve yumurta dâhil olmak üzere tüm gıdalar dâhildir (Pleissner ve Kin, 2013). Avrupa'da toplam gıda atık ve yan ürünlerinin yüzde dağılımı; % 42 evsel atık, %39 gıda üretim ve işleme sanayi, % 14 catering sektörü ve % 5 toptan ve perakende sektörü kaynaklıdır (FAO, 2013). Avrupa'da kişi başına düşen yıllık gıda atık miktarının ise 280-300 kg'a ulaştığı belirtilmektedir (FAO, 2013). TÜİK 2011 verilerine göre Türkiye'nin toplam atık miktarının 25.8 milyon ton olarak olduğu belirtilmektedir (Topkaya, 2017).

Dünya nüfusunun giderek artmasıyla birlikte gıda atık ve yan ürün miktarlarının da artacağı öngörülerek insan sağlığı, çevre kirliliği ve ekonomi açısından bunların doğru bir şekilde değerlendirilmesi giderek önem kazanmaktadır. Bu nedenle açığa çıkan bu atıkların değerlendirilmesi hem ekonomik açıdan hem de çevre kirliliğinin önlenmesi açısından oldukça önemlidir. Gıda atıklarının değerlendirilmesi konusunda yapılacak çalışmalar, çevre kirliliğinin önlenmesine, gıdaların zenginleştirilmesine, değerli bileşenlerin insan metabolizmasına girmesine, katma değer oluşturularak ekonomiye katkı sağlanmasına ve gıda sanayinin gelişmesine katkı sunacağından önem arz etmektedir (Yağcı vd., 2006).

Avrupa Birliği'nin izlediği atık yönetimi yaklaşımı yalnızca atıkları yönetmekten çıkmış olup kaynakların geri kazanımını da içermektedir. Avrupa Birliği, "daha azla daha fazla yapmak" anlayışını benimseyerek atıkları önemli bir kaynak olarak görmektedir ve atıkların geri dönüşümü ve geri kazanımında çeşitli uygulamalara sahiptir (Veral ve Yiğitbaşıoğlu, 2018). Çevre politikası AB'de 1970'lerden itibaren oluşmaya başlamıştır ve çeşitli ilkeler doğrultusunda belirlenen çevre politikası ile çevre eylem programları oluşturularak ve bu programlar çerçevesinde hareket edilerek bilinçli bir çevre politikası belirlenmiştir (Çokgezen 2007). Son dönemdeki en önemli gelişmelerden biri ise 2 Aralık

2015 tarihinde atık yönetimi ile ilgili kapsamlı bir eylem planını içeren Döngüsel Ekonomi Paketinin Avrupa Komisyonu tarafından kabul edilmesi olmuştur (Veral ve Yiğitbaşıoğlu, 2018). Döngüsel Ekonomi (Circular Economy) yeni bir üretim sistematiğidir ve Avrupa Komisyonu bu sistematiikle Avrupa'nın sürdürülebilir ekonomik büyümeyi hızlandırmasını ve küresel rekabetteki yerini sağlamlaştırmasını beklemektedir (EC, 2015). Komisyonun bu paketi açıklaması aynı zamanda 2030 Sürdürülebilir Kalkınma Gündemindeki hedefleri uygulamaya yönelik de bir adımdır (EC, 2015). Döngüsel ekonomi AB için daha akıllı, kapsayıcı büyüme öngören ve sürdürülebilir bir Avrupa 2020 Stratejisi için kaynak verimliliği sağlayacak bir sistemdir (Veral ve Yiğitbaşıoğlu, 2018). Avrupa Birliği'nin çevre politikasının ilkeleri; bütüncülük ilkesi, yüksek seviyede koruma ilkesi, ihtiyat ilkesi, önleme ilkesi, kaynakta önleme ilkesi ve kirleten öder ilkesi olarak sıralanabilir (Çokgezen, 2007). Bütüncülük ilkesi diğer politikalar ile çevre korumasının entegrasyonunu; yüksek seviyede koruma ilkesi topluluğun tüm kurumlarının (Avrupa Komisyonu, Avrupa Parlamentosu ve Avrupa Konseyi) çevre politikalarını dikkate alarak karar almalarını; ihtiyat ilkesi alınacak kararların çevreye etkisinin test edilmeden önlem alınmasını; önleme ilkesi zarara uğramadan önce önlem alınmasını; kaynakta önleme etkisi; çevreye olacak zararın kaynağında önlenmesini; kirleten öder ilkesi ise; temel taş bir ilke olup kirletenlere neden oldukları kirlilik ve mücadelenin bedelinin ödetilmesini içermektedir (Çokgezen, 2007).

AB'de 1992'ye kadar çevre ile ilgili FEOGA (Avrupa Tarımsal Yönlendirme ve Garanti Fonu), FSE (Avrupa Sosyal Fonu) ve FEDER (Avrupa Bölgesel Kalkınma Fonu) fonlarının kullanıldığı görülmektedir. Daha sonra bu fonlara uyumlaştırma fonu (Maastrich Anlaşması) da eklenmiştir (Çokgezen, 2007).

Gıda atıklarının besin değerinin oldukça zengin olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır. Özellikle protein içeriği yüksek bitkisel kaynaklı gıda atıklarının değerlendirilmesine yönelik çalışmalara son yıllarda ağırlık verilmektedir (Görgüç, 2018). Bu atıklardan bazıları pirinç kepeği, yulaf kepeği, ayçiçeği küspesi, yulaf küspesi ve buğday kepeğidir (Gao, Smith ve Tsompo, 2014; Hanmoungjai, Pyle ve Niranjan, 2001). Yapılan çalışmalarda meyve ve sebzelerin kabuk, çekirdek ve sap gibi kısımlarının değerli biyoaktif bileşenler içerdiği ve besin değerlerinin yüksek olduğu belirtilmektedir (Tuna, 2015). Örneğin portakal kabuğundaki fenolik bileşenlerin kabuksuz portakala göre % 15 daha fazla; elma, şeftali ve armut meyvelerinin kabuklarındaki fenolik bileşenlerin meyve kısmına göre 2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Gorinstein vd., 2002).

Çevre kirliliği ve artan popülasyonun gıda kaynaklarını sınırlandırması, atıklar ve yan ürünlerin değerlendirilmesi sonucu elde edilecek ekonomik kazançlar, endüstriyel gıda atıklarının değerlendirilmesini bir gereklilik haline getirmektedir (Tuna, 2015). Yağ ekstraksiyonu sonrası yağlı tohum posalarında proteinler oldukça konsantre olur ve protein içeriklerinin % 60'a kadar çıkabileceği ucuz yan ürünlerden protein ürünleri üretilebilir. Ekonomik nedenlere ek olarak, yağlı tohum posalarından protein ürünlerinin üretimi, yan ürünleri azaltma yoluyla çevresel sorunların çözümüne de katkı sağlayacaktır (Coşkun vd., 2019).

Bu projede, gıda sanayi yan ürünlerinden olan fındık ve çörek otunun soğuk preslenmesi ile yağ eldesi sonucu açığa çıkan posaları değerlendirmek amacıyla bitkisel protein izolatları ve hidrolizatlarının biyoaktif özelliklerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2.2 Soğuk Pres Yöntemi ile Yağ Eldesi

Yağlı tohumlardan yağ elde etme yöntemleri arasında çözücü ekstraksiyonu, mekanik yöntemler, enzim destekli ekstraksiyon, yüksek basınç ekstraksiyonu, damıtma, hidrolik pres gibi birçok farklı metot kullanılmaktadır (Çakaloğlu, Özyurt ve Ötleş, 2018). Mekanik yöntemler genellikle yağ içeriği % 20'nin üstünde olan yağlı tohumların işlenmesinde kullanılmaktadır (Zuorro vd., 2014). Proses, uygulanan sıcaklığa bağlı olarak sıcak veya soğuk presleme olarak adlandırılır (Çakaloğlu, Özyurt ve Ötleş, 2018).

Çözücü kullanılarak uygulanan ekstraksiyon yöntemleri toksik atıklar oluşturma potansiyeline sahiptir (Çakaloğlu, Özyurt ve Ötleş, 2018). Bu nedenle yüksek kalitede yağ ürünleri üretme ve çevre koruma düşünceleri mekanik yöntemlerin kullanımına sebep olmaktadır (Richter vd., 1996). Ayrıca presleme yöntemi ile yağ eldesi prosesinin bir yan ürünü olarak protein bakımından zengin pres keki elde edilmektedir (Singh ve Bagale, 2000). Presleme yönteminde, çözücü ekstraksiyonu yöntemi kadar yüksek verimle yağ elde edilememesi bu yöntemin dezavantajıdır (Çakaloğlu, Özyurt ve Ötleş, 2018). Ham maddenin soyulması, kurutulması, çözücü ile ya da enzimatik olarak işlenmesi gibi ön işlemler ve besleme hızı ve sıcaklık gibi işlem parametreleri yağ verimi açısından büyük rol oynamaktadır (Savoire, Lanoiselle ve Vorobiev, 2013).

Soğuk presleme yönteminde ham maddelere ısı işlem uygulanmadığından oksidatif kalitesi yüksek yağ ürünleri elde edilmektedir (Çakaloğlu, Özyurt ve Ötleş, 2018). Bitkisel yağların insan metabolizmasındaki ana fonksiyonlarına ek olarak içerdikleri biyoaktif bileşenleriyle insan sağlığına olan olumlu katkılarından dolayı soğuk pres yoluyla üretilen bitkisel yağlara tüketici ilgisi gittikçe artmaktadır (Matthous ve Brühl, 2003).

Özetlemek gerekirse soğuk pres yağ üretim teknikleri; basit, ekolojik, düşük maliyetli, zararlı organik çözücü gerektirmeyen ve yüksek kalitede ürün eldesi sağlayan bir yöntemdir (Gürpınar, Geçgel ve Taşan, 2011). Ancak ham maddeden elde edilen yağ verimi düşüktür ve ürün standardını yakalamak zordur (İmer ve Taşan, 2018).

2.3 Amino asitler

Amino asitler, yapılarında hem amino grubu (NH_2) hem de karboksil grubu (COOH) içerirler. Doğada 300 kadar farklı amino asit bulunmaktadır. Bunların içinden proteinlerin yapısal ünitelerini oluşturan 20 amino asit, standart amino asitler olarak bilinmektedir (Bilişli, 2009). Standart amino asitler, α -karbon atomuna bağlanmış bir amino grubu ve bir karboksil grubu içerirler. Fizyolojik pH değerinde amino grubu pozitif yüklüdür; karboksil grubu ise negatif yüklüdür. Standart amino asitler, üç harfli kısaltmalar ve tek harfli sembollerle gösterilirler (Altınışik, 1998). Amino asitlerin özellikleri R grubuna bağlı olarak değişmektedir.

Genel olarak amino asitlerin çoğu suda çözündükleri halde alifatik (Ala, Leu, Met, Pro) ve aromatik (Phe, Trp, Tyr) amino asitler hidrofobik özellik gösteren grupları taşıdıklarından sudaki çözünürlükleri sınırlıdır. Ortama asit veya baz eklenmesiyle ortamda tuz oluşumu sağlandığında bu amino asitlerin çözünürlüğü artmaktadır. Ortamda diğer amino asitlerin bulunması da çözünürlüğü desteklemektedir. Amino asitler alkollerdeki çözünürlükleri düşük olup diğer eter, kloroform ve aseton gibi non-polar organik çözücülerde çözünmemektedirler. Amino asidin çeşidine bağlı olarak etil alkolde çözünürlük derecesi değişmektedir. Örneğin, prolin ve hidroksoprolin etanolde iyi çözünür. Amino asitlerin alkolde çözünürlük derecelerinin düşük olması polar özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Bilişli, 2009).

Asidik ve bazik karakterleri bir arada taşıyan bileşikler amfoter olarak adlandırılırlar. Amino asitler çözelti pH değerine bağlı olarak asit, baz veya zwitterion (iç tuz) şeklinde davranmaktadırlar. Bu nedenle amino asitler amfoter özellik gösterirler. Amino asidin zwitterion şekline geçtiği pH değerine izoelektrik nokta adı verilmektedir. Her amino asit için izoelektrik noktada pH değerleri farklılık göstermektedir. Amino asitler, izoelektrik nokta değerinden yüksek pH ortamında anyon, düşük pH ortamında ise katyon şeklindedir.

Amino asitler maksimum UV absorpsiyonunu farklı dalga boylarında gösterirler. Aromatik amino asitler 200-230 nm ve 250-290 nm dalga boylarında maksimum UV absorpsiyonunu göstermektedirler. Protein ve peptitlerin tayinlerinde 280 nm'de alınan absorpsiyon değerleri kullanılmaktadır.

2.4 Peptitler

Peptitler, amino asitlerin polimerleridirler. Kuramsal olarak, bir amino asidin α -karboksil grubunun OH'i ile diğer amino asidin α -amino grubu aralarında su vererek peptit bağı oluştururlar.

Peptit bağı, bir amino asidin α -karboksil karbonu ile bir başka amino asidin α -amino azotu arasında oluşur. Peptit bağı kovalent bir bağ olup oldukça kuvvetlidir. Peptit yapısı iki amino asitten oluşuyorsa dipeptit, üç amino asitten oluşuyorsa tripeptit, çok sayıda amino asitten oluşuyorsa polipeptit adını almaktadır. Proteinler, yüzlerce amino asitten oluşan polipeptitlerdir (Altınışık,1998; Bilişli, 2009).

Bir peptit dizisindeki amino asitler, genellikle amino asit kalıntıları olarak adlandırılırlar. Peptidin α -karboksil grubuna sahip amino asit kalıntısı bulunan ucuna C-terminal uç, serbest α -amino grubuna sahip amino asit kalıntısı bulunan ucuna ise N-terminal uç denilmektedir (Altınışık,1998).

Biyolojik öneme sahip pek çok peptit bulunmaktadır. Bazı peptitler proteinlerin kısmi hidrolizinden meydana gelirken bazıları ise özel peptitlerdir.

2.4.1 Biyoaktif peptitler

Biyoaktif peptitler kısaca vücut fonksiyonları üzerinde olumlu etkisi olan, proteinlerin spesifik parçalanma ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Bir diyet bileşeninin biyoaktif olarak kabul edilebilmesi için fizyolojik olarak ölçülebilir bir biyolojik etki sağlaması gerekmektedir. Bu biyoaktivitenin toksisite, alerjenite ve mutajenite gibi potansiyel olarak zararlı etkilerin dışında, sağlığı olumlu etkileme potansiyeline sahip olması gerekmektedir (Möller vd., 2008). Biyoaktif peptitler, amid veya peptit bağları olarak da bilinen kovalent bağlarla bağlanmış amino asitlerden oluşan organik maddeler olup hormon veya ilaç benzeri aktiviteler gösterebilirler. Peptitler, sentetik olarak ya da doğal proteinlerin fermentasyonu ve enzimatik hidrolizi ile üretilebilirler. Biyoaktif peptitlerin protein kaynağından enzimatik hidroliz yolu ile üretilmesinde bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kökenli proteolitik enzimler kullanılmaktadır. Biyoaktif peptitlerin üretimi için en çok kullanılan enzimler arasında hayvansal kökenli pepsin, tripsin, kimotripsin ve bitkisel kökenli bromelain, papain ve fisin proteazları bulunmaktadır. Bunların dışında alkalaz, termolisin gibi mikrobiyal kökenli proteolitik enzimler de sıkça kullanılmaktadır (Anusha ve Bindhu, 2016; Ohata vd., 2016; Pihlanto-Leppälä, 2000).

Peptitlerin biyoaktiviteleri, proteinlerin yapısından koparıldıktan sonra fizyolojik modülatörler olarak hareket edene kadar gizlidir. Bir peptidin kimyasal yapısı ve

aktivitesi arasındaki ilişki tahmin edilememekle birlikte aktivite amino asit sekansı, N ve C-terminal amino asidin türü, peptit zincirinin uzunluğu, peptiti oluşturan amino asitlerin yük ve polaritesi gibi özelliklerle ilişkilendirilir (Li ve Yu, 2015).

Genellikle 2-20 amino asitten oluşan biyoaktif peptitler bazı durumlarda daha fazla amino asit içerebilir. Sindirim sisteminde enzimatik hidrolizle ortaya çıkabilen biyoaktif peptitler kan dolaşımına geçerek sistematik faydalar sağlayabilirler. Biyoaktif peptitler amino asit dizilimlerine bağlı olarak antimikrobiyal, antioksidan, antidiyabetik, antihipertansif gibi özelliklere sahip olabilmektedirler. Bazı biyoaktif peptitler multifonksiyonel olup birden fazla fonksiyonel fayda sağlayabilirler (Erdmann vd., 2007; Harnedy ve FitzGerald, 2012). BIOPEP adında bir veri tabanında 3796 farklı fonksiyonel önemi olan peptit bildirilmiştir.

2.4.2 Proteolitik Hidroliz ve Enzim Dışı Yöntemler

Biyoaktif peptitler; bitkilerden, hayvanlardan ya da mikroorganizmalardan gelen proteolitik enzimler kullanılarak *in vitro* enzimatik hidrolizle, gastrointestinal sindirim simüle edilerek *in vivo* enzimatik hidrolizle, kültürler kullanılarak fermentasyon yoluyla ve kimyasal sentez yoluyla (enfuvirtid vb.) üretilmektedir (Agyei ve Danquah, 2011). Bu yöntemler kombine bir şekilde de kullanılabilir (Chakrabarti, Guha, ve Majumder, 2018). Hidrolizden sonrası izolasyon ve saflaştırma aşamaları gerçekleştirilerek biyoaktif peptitler elde edilmektedir (Agyei ve Danquah, 2011).

Gıda proteinlerinden biyoaktif peptitlerin üretilmesinde kullanılan en yaygın yöntemler, enzimatik hidroliz veya fermantasyon olmakla beraber, enzimatik hidroliz daha çok kullanılmaktadır (Lee ve Hur, 2017). Enzimatik hidroliz, özellikle gıda ve ilaç endüstrisinde, organik çözücü ve toksik kimyasallar içermemesinden dolayı tercih edilmektedir (Kim ve Wijesekara, 2010). Bu nedenle protein materyalinden belirli bir sıcaklık ve pH'da enzimatik hidroliz yoluyla protein hidrolizatlarının hazırlanması günümüzde önemli bir araştırma alanı olmuştur.

Proteinlerin enzimatik hidrolizi; amino asitlerden ve peptitlerden proteinleri oluşturan peptit bağlarının bölünmesiyle gerçekleşmektedir. Elde edilen hidrolizat ise amino asit ve peptit karışımından oluşmaktadır (Ulagesan, Kuppusamy ve Kim, 2018). Gıda kaynaklı proteinlerin enzimatik hidrolizi sırasında biyoaktif peptitlerin salınımını; protein tipi ve konsantrasyonu, enzim hazırlama ve konsantrasyonu, çözücü, pH ve iyonik kuvvet gibi içsel faktörler ya da sıcaklık ve basınç gibi dışsal faktörler etkileyebilmektedir (Nongonierma vd., 2017). Örneğin; peptit bağının bölünebilmesi için enzimin seçiciliği,

pH veya substrat konsantrasyonu ile bağlantılı olabilir (Butre vd., 2015). Bu nedenle etkili biyoaktif hidrolizatların oluşumu için çok faktörlü deney tasarımı ve yüzey yanıt metodolojisi ile optimum hidroliz parametreleri belirlenebilmektedir (Contreras vd., 2011).

Gıda proteinleri genellikle tripsin, pepsin, kimotripsin, bromelain, fisin veya papain gibi enzimler kullanılarak hidrolize edilir (Chakrabarti, Guha, ve Majumder, 2018). Bitkisel ve hayvansal kaynaklı yaygın olarak kullanılan enzimler α -kimotripsin ve papain enzimleridir (Kim ve Wijesekara, 2010). Bazı çalışmalarda nötraz, termolisin, pepsin, alkalaz, pronaz, karboksipeptidaz A ve tripsin enzimlerinin proteolitik hidroliz için uygun olan pH ve sıcaklık koşulları altında olduğu belirtilmektedir. Yaygın olarak kullanılan mikrobiyal kaynaklı proteazlar, laktik asit bakterilerinden olan *Bacillus* spp. ve *Bifidobacterium*'dan elde edilmektedir (Pedroche vd., 2007). Mikrobiyal kaynaklı proteazların diğer kaynaklardan elde edilen proteazlara karşı bazı avantajları bulunmaktadır. Minimum besin ihtiyacı ve olgunlaşma süresinin kısa olması nedeniyle mikroorganizmaları yetiştirmek nispeten daha az maliyetlidir; ikincisi özellikle LAB bakterileri olmak üzere çoğu mikroorganizmanın proteazları hücre zarından alındığı için saflaştırma nispeten daha az maliyetlidir; son olarak ise mikrobiyal kaynaklı proteazlar doğada bulunan mikroorganizmalar kadar çeşitlidir (Gobbetti, Smacchi ve Corsetti, 1996). Kullanılan enzim türüne bağlı olarak peptid dizileri ve biyolojik etkinlikleri değişebilmektedir. Bununla beraber hidroliz derecesinin iyi bir düzeyde olması için ise enzim/substrat oranı dikkate alınması gereken önemli bir faktördür (Mojica ve Mejía, 2017). Kısa peptid zincirleri içeren hidrolizatların üretilmesinde, enzimlerin optimum pH ve sıcaklıklarına bağlı olarak, birden fazla proteolitik enzim kullanılabilir (Khiari, Ndagijimana ve Betti, 2016). Elde edilen hidrolizatların biyolojik aktiviteleri değerlendirildikten sonra en güçlü sekansların bulunması amacıyla saflaştırma ve tanımlama işlemleri gerçekleştirilir (Chakrabarti, Guha, ve Majumder, 2018).

Enzimatik hidroliz; yüksek ürün kalitesi ve verimi, son üründe kalıntı toksik kimyasalların ve organik çözücülerin bulunmaması, istenmeyen ürün miktarı düşüklüğü ve ılımlı reaksiyon koşullarıyla kimyasal senteze göre avantajlara sahiptir (Sarmadi ve İsmail 2010). Ayrıca reaksiyon süresinin daha kısa olması, ölçülebilirliğinin kolaylığı ve daha öngörülebilir olması nedenleriyle mikrobiyal fermentasyondan daha fazla tercih edilmektedir (Sangsawad, Roytraku ve Yongsawatdigul, 2017).

Mikrobiyal fermentasyon, bazı bakteri veya mayaların büyüdükçe proteinleri enzimleriyle hidroliz etmeleri için protein substratları üzerinde kültürlenmesini içermektedir. Hidrolizin derecesi ise kullanılan suşa, protein tipine ve fermentasyon süresine bağlıdır. Elde edilen protein hidrolizatlarının işlevselliği ise mikroorganizmaların farklı proteolitik

enzimlere sahip olmalarından dolayı farklılık göstermektedir (Daliri, Oh ve Lee, 2017). Kullanılan mikroorganizmanın proteolitik potansiyelini arttırmak için ekim koşulları kontrol edilebilir (Marugg vd., 1995).

Sonuç olarak gıda proteinlerinden elde edilen biyoaktif peptit sayısı; enzim tipi ve kullanılan mikroorganizma(lar) gibi faktörlerin optimize edilmesiyle ya da mikrobiyal fermantasyonun enzimatik hidroliz ile birleştirilmesiyle artırılabilir. Enzimatik hidroliz reaksiyon ortamı, enzimlerin optimum pH ve sıcaklıklarına göre ayarlanmasıyla reaksiyonda bir dizi enzim kullanılması mümkündür (Agyei ve Danquah, 2011). Enzimatik hidroliz sırasında potansiyel biyoaktif peptitlerin salınımının artırılmasıyla daha yüksek biyoaktif etki elde edilebilmektedir. Çörek otu proteinlerini hidrolize etmek amacıyla çalışmamızda, sahip olduğu üstünlükler nedeniyle enzimatik hidroliz yöntemi kullanılmıştır.

2.4.3 Antihipertansif peptitler

Anjiyotensin I-dönüştürücü enzim (ACE) yoğun olarak glikozidik bağlar içeren, membrana bağlı bir çinko metalloproteazıdır. ACE, atardamarlardaki kan basıncını, su ve tuz dengesini belirleyen renin-anjiyotensin sisteminde önemli bir role sahiptir. Bu enzim, anjiyotensin I hormonunu, bir damar daraltıcı (vazokonstriktör) olan anjiyotensin II hormonuna çevirir ve buna ek olarak; bradikinin ismiyle bilinen peptidi de yıkıma uğratarak, bu peptidin damar genişletici (vazodilatör) fonksiyonunu engeller. Bu şekilde, ACE, tansiyonu yükseltir ve kandaki sıvı ve tuz dengesini belirler (Hartmann & Meisel, 2007; Vermeirssen vd. 2004).

Anjiyotensin I-dönüştürücü enzim (ACE) önleyici peptitler, hipertansiyonu düşürme potansiyeli olan biyoaktif peptitlerdir. ACE önleyici peptitler, biyoaktif peptitler arasında üzerinde en çok çalışma yapılan alandır (Iwaniak vd., 2014). Bir ACE inhibe edici peptidin potansiyeli genellikle, ACE aktivitesinin % 50 inhibe edilmesini sağlayan peptit konsantrasyonuna eşdeğer olan IC_{50} değeri şeklinde ifade edilir. ACE inhibe edici aktivite, bir ACE inhibisyon göstergesi veya tanımlanmış bir inhibitör peptit konsantrasyonu ile elde edilen inhibisyon yüzdesi olarak da ifade edilebilir (Murray ve FitzGerald, 2007).

Besin kaynaklı ACE inhibe edici peptitlerin yapı-aktivite ilişkisi henüz tam olarak belirlenememiş olmasına rağmen, bir ACE inhibe edici peptidin nihai potansiyelini etkilediği görünen birçok yapısal özellik tanımlanmıştır. Örneğin bazı anyonik peptitler, ACE'de bulunan çinkoyu şelatlamasına bağlı olarak inhibisyon sağlayabilir (Aluko, 2015). Güçlü bir antihipertansif aktivite için peptit sekansında bazı amino asit

kalıntılarının varlığı ve pozisyonunun kritik olduğu düşünülmektedir. Ruiz vd. (2004) bir C-terminal Leu'nun ACE inhibe edici potansiyelin artmasına önemli ölçüde katkıda bulunabileceğini ileri sürmüştür. Nakamura vd. (1995), Val ve Ile gibi dallı amino asitlerin varlığının ACE aktivitesinin inhibisyonu için önemli olduğunu ve termolisine ile hidroliz edilen proteinlerin, terminal bölgesinde bu dallı amino asitleri içeren peptitleri üretme şansını arttıracaklarını bildirmiştir. ACE monekülüne bağlanma, substratın veya inhibitörün C-terminal tripeptit dizisinden kuvvetli bir şekilde etkilemektedir. Birçok çalışmada tripeptitlerin ACE inhibitörleri olarak dipeptitlerden daha güçlü aktivite göstermiştir. ACE, üç C-terminal pozisyonunun her birinde hidrofobik (aromatik veya dallanmış yan zincirler) amino asit kalıntıları içeren substratlarla veya inhibitörlerle daha iyi etkileşim sağlamaktadır. Doğal olarak oluşan birçok ACE inhibe edici peptit, özellikle dipeptit ve tripeptit inhibitörleri C-terminal ucunda Tyr, Phe, Trp, Pro veya Lys amino asitlerini içermektedir. Peptit sekansının C-terminalinde Pro varlığı ACE inhibisyonunu arttırmaktadır. Bu neden ile prolin amino asidi esas yapı olarak düşünülerek ilaç tasarımları yapılmış ve geliştirilen ilk madde süksinil-L-prolin olmuştur (Bayram, 2012; Murray ve FitzGerald, 2007; Nakamura vd., 1995).

Peptit zincirinde belirli amino asitlere ait pozisyonun ACE inhibisyonuna etkisi üzerindeki rolünü inceleyen çalışmalar genellikle *in vitro* deneyler üzerinden yürütülmüş ve istatistiksel modellemeler ile birleştirilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, C-terminal diziliminin ACE inhibisyonu için önemli olduğu konusunda tutarlıdır. Yine de C-terminal aktivitesini arttırmak için hangi spesifik amino asitlerin bulunması gerektiği konusunda çelişkiler vardır (Patil vd., 2015). Bazı ACE inhibitör peptitleri, C-terminalinde Lys veya Arg içermektedir. Yapı-aktivite verileri, C-terminal Arg veya Lys yan zincirlerindeki pozitif yüklü grubun, inhibe edici aktivitelere önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu durum Ondetti ve Cushman (1982) tarafından belirtilen ACE aktif alan modeline uymamaktadır. Bu sebeple ACE inhibisyon mekanizmasının, normalde substratlar tarafından işgal edilmeyen alt tabakalarla veya enzimin katalitik bölgesinden farklı bir anyonik inhibitör bağlanma bölgesi ile etkileşimi olduğu iddia edilmektedir (FitzGerald ve Meisel, 2000; Meisel, 1993).

BIOPEP gibi bazı veri tabanları peptitlerin potansiyelini tanımlamaya çalışmaktadır. BIOPEP uygulaması, biyolojik olarak aktif peptit dizilimlerinin bir veri tabanını, protein parçalarında potansiyel biyolojik aktivite profillerinin oluşturulmasını, proteinlerin değeri ölçüsünde kantitatif tanımlayıcıların hesaplanması ve bir protein zincirinde endopeptidazlar ile hidrolize duyarlı bağların tahmin edilmesini sağlayan bir program içerir. Ayrıca alerjik ve toksik özelliklerin öngörülmesi için programlar da geliştirilmiştir (Minkiewicz vd., 2008).

BIOPEP veri tabanı kullanılarak örnek bir çalışma olarak iyi bilinen bir ACE inhibitörü VPP peptidinin inhibisyon mekanizması incelenmiştir. Bu peptidinin bağlanabileceği 14 farklı amino asit olduğu ve üç amino asit bağlantısının (His387, His410 ve Ala 412) VPP tripeptidine spesifik olduğu gözlenmiştir. Bu peptidinin ilgili daha detaylı bilgiler bölüm 3.6'da verilecektir.

2.4.4 Antidiyabetik peptitler

Biyoaktif peptitlerin önleyici ve tedavi edici özellikleri üzerine en çok çalışma yapılan hastalıklardan biri diyabettir. Diyabet 21. yüzyılın en önemli sağlık problemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Diyabet, pankreasın insülin üretimindeki yetersizliği veya salgılanan insülinin etkisizliği nedeniyle ortaya çıkan en yaygın bulaşıcı olmayan hastalıktır. Dünyadaki diyabetli hasta sayısı 1980'de 108 milyon iken, 2014'te 422 milyona çıkmış ve 2040 yılı için bu sayının 642 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir. (Agarwal ve Gupta, 2016; Arrutia vd., 2016; Sebokova vd., 2007). Günümüzde diyabet tedavisinde glukoz ve kilo kontrolü sağlayan inkretin bazlı tedaviler geliştirilmiştir. Bu tedaviler Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) reseptör agonistleri ve dipeptidil peptidaz-IV (DPP-IV) inhibitörleri ile sağlanmaktadır. Besin alımının ardından bağırsaktan salgılanan hormonlar inkretin hormon ve oluşturdukları etki de inkretin etkisi olarak tanımlanmaktadır. İki önemli inkretin hormon, glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve glukoz bağımlı insülinotropik peptid (GIP). İnkretinler pankreasta glukoz bağımlı insülin salgılanmasını artırırken, glukagon salgılanmasını baskılar. İnkretin hormonlarının, glukoz tehdidinde karşı insülin cevabına % 70'ten daha fazla katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir (Nauck vd., 2009; Holst ve Gromada, 2014).

Dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV; EC.3.4.14.5), farklı biyolojik işlemlerde yer alan çok işlevli bir transmembran glikoproteindir. Prolin veya alanin kalıntılarından sonra dipeptitleri seçici bir şekilde kesen bir serin proteazdır. DPP-IV bağırsağın sindirim ve absorpsiyon mekanizmalarında anahtar enzimdir. Bu enzimin aktivitesi, GIP gibi inkretinlerin yıkımına neden olmaktadır. Tip-2 diyabetlilerde GLP-1'in bozulmuş salgılanmasının ve GIP'in hatalı etkisinin bir kombinasyonu nedeniyle inkretin etkisi azalır. Bu durum kan şekerinin artmasına neden olur ve kan damarları ve sinirler başta olmak üzere vücut dokusuna zarar verir. DPP-IV inhibisyonu, glukagon benzeri peptid 1'in (GLP-1) inaktivasyonunu önler ve aktif GLP-1 oranını artırır. Protein hidrolizatlarında DPP-IV'ü *in vitro* inhibe edebilen ve *in vivo* kan glukoz seviyesini düşürebilen biyoaktif peptitler üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Ahren, 2007; Barnett, 2006; Mazorra-Manzano vd., 2018).

Lacroix ve Li-Chan (2012a) tarafından yapılan *in silico* çalışmada, 34 proteini değerlendirmiş ve DPP-IV inhibitör aktivite gösterdiği literatür verileri ile eşleşen 2256 peptit sekansı bulunmuştur. Gly-Ala, Gly-Pro ve Pro-Gly en sık görülen sekanslar olarak bildirilmiştir. Sığır eti ve somondan elde edilen kollajen ve inek sütünden elde edilen kazein proteinleri DPP-IV inhibitörleri üretmek için en yüksek potansiyeli göstermişlerdir. Sonrasında Lacroix ve Li-Chan (2012b) tarafından DPP-IV inhibitörlerinin doğal kaynakları olarak süt proteini hidrolizatları araştırılmıştır. Çalışmadaki sonuçlara göre, *in vitro* pepsin-pankreatin sindirimi boyunca sodyum kazeinat, yağsız süt tozu ve süt proteini konsantresi hidrolizatlarının DPP-IV inhibisyon aktiviteleri artarken peynir altı suyu proteini izolatu (Whey Protein Isolate, WPI) hidrolizatı, peptik sindirimin ardından en yüksek inhibitör aktivite göstermiştir. 11 farklı proteaz kullanılarak sodyum kazeinattan üretilen hidrolizatlar, çoğu WPI hidrolizatından daha yüksek inhibe edici aktivite göstermiştir. Farklı 11 proteaz arasından termolisin ve Umamizyme K proteazları en yüksek DPP-IV inhibe edici aktiviteye sahip olan WPI hidrolizatlarını üretmiştir (sırasıyla %51 ve %47 inhibisyon). En yüksek DPP-IV inhibe edici aktiviteye sahip sodyum kazeinat hidrolizatları ise termolisin ve bromelain proteazları (sırasıyla %50 ve %47 inhibisyon) ile elde edilmiştir. Bununla birlikte, araştırılan tüm enzimatik muameleler arasında, WPI'nin peptik sindirimi en yüksek DPP-IV inhibitör aktivitesine neden olmuştur (IC₅₀ değeri 0.075 mg/ml).

2.4.5 Antioksidatif peptitler

Süperoksit radikal, hidroksil radikal, hidrojen peroksit ve peroksit radikali gibi reaktif oksijen molekülleri gıdalarda ve canlılar üzerinde de olumsuz etkilere neden olurlar. Oksidatif stres, bu serbest radikal gruplardaki artış ve antioksidatif savunma sistemleri arasındaki dengesizlik sonucu ortaya çıkar. Yapılan araştırmalarda oksidatif stresle kalp rahatsızlığı, diyabet, kanser, Alzheimer gibi birçok rahatsızlığın arasında bir bağlantı olduğu öne sürülmüştür. Örneğin diyabette artmış bir oksidatif stres durumu gözlenmektedir ve oksidatif stresin diyabette mikro ve makrovasküler komplikasyonlara neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından vurgulanmaktadır. Antioksidanlar, oksidatif stres durumunu kontrol altına alabilir, oksitlenebilir bir substratın oksidasyonunu geciktirebilir veya önleyebilirler (Chakrabarti vd., 2014; Li ve Yu, 2015; Ünal vd., 2018; Pisoschi ve Pop, 2015).

Bütillenmiş hidroksitolüen (BHT) ve bütillenmiş hidroksianisol (BHA) gibi sentetik antioksidanlar, doğal antioksidanlara kıyasla etkili ve düşük maliyetli oldukları için gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ancak bu sentetik antioksidanların laboratuvar hayvanlarında karaciğer hasarına ve karsinogeneze neden olduğuna dair şüphelenilmekte ve bu nedenle gıda katkı maddesi olarak kullanımları kısıtlanmıştır.

Birçok antioksidan, gıdalar da dâhil olmak üzere doğal ham maddelerden izole edilmektedir. Peptitler ve amino asitlerin, pro-oksidatif metal iyonlarının bağlayıcı etkileri nedeniyle antioksidan özellikleri bulunmaktadır. (Chen vd., 2007).

Peptitlerin antioksidatif etkisi daha çok peptitlerin yapıları, hidrofobik özellikleri ve elektron transferi ile ilişkilendirilmektedir (Lemes vd., 2016). Peptitlerin sahip oldukları antioksidan aktiviteler, içerdikleri amino asitlerden kaynaklanmaktadır. Örneğin, tirozin, fenilalanin ve triptofan gibi aromatik amino asitlerin ve kükürt içeren bir amino asit sisteinin antioksidan aktiviteleri protonları serbest radikallere verme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Lizin, arjinin gibi bazik amino asitlerle, aspartik asit, glutamik asit gibi asidik amino asitler metal iyonları ile şelat oluşturma yeteneğine bağlı olarak antioksidan aktivite sergilerler. Bazik bir amino asit olan histidinin, imidazol halkası nedeniyle hem radikal temizleyici hem de metal şelatör gibi davranabileceği bildirilmiştir. Peptit yapısında bulunan amino asitlerin yanı sıra bu amino asitlerin peptit sekansındaki yerleri de antioksidatif etki üzerinde önemlidir. Örneğin N-terminal ucunda prolin içeren peptitlerin linoleik asidin oksidasyonunu engellemekte çok daha etkin olduğu, N-terminal ucunda histidin içeren peptitlerin güçlü metal şelatlama yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Arcan ve Yemenicioğlu, 2007; Chen vd., 1995)

2.5 Protein ve peptitlerin saflaştırılmasında kullanılan kromatografik yöntemler

Genel olarak, biyolojik moleküllerin saflaştırması için hedef bileşiğin fiziksel, kimyasal veya biyolojik özelliklerine göre uygun olan kromatografik yöntemler seçilir. Proteinlerin saflaştırmasında moleküler büyüklük ve kütleğe göre ayırım yapılacaksa jel filtrasyon kromatografisi, proteinlerin taşıdıkları net yüklere göre ayırım yürütülecekse iyon değişim kromatografisi, biyolojik aktivite özelliklerinin söz konusu olduğu durumlarda affinite kromatografisi ve polariteye göre ayırım tasarlandığında ters faz kromatografisi veya hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemlerinden yararlanılmaktadır (GE Healthcare, 2010). Kolon kromatografisi, iki faz arasında proteinleri ayırıştırma prensibine dayanmaktadır. Bu iki faz:

Sabit (katı) faz: genellikle kolonun dolgu maddesi (matris)

Mobil (sıvı) faz: genellikle kolondan geçirilen bir tampon çözeltisi (elüsyon çözeltisi, elüant) olarak tanımlanır.

Jel filtrasyon kromatografisi haricindeki tüm kromatografilerde proteinlerin kolon dolgu maddesine adsorpsiyonu sağlanarak ayırıştırma yapılır. Uygun bir sıvıda çözündürülmüş olan protein kolona enjekte edilir. Protein dolgu maddesi tarafından adsorplanarak kolona tutunur. İdeal koşullarda hedeflenen proteinin tutulması, diğerlerinin ise elüsyon

tamponuyla kolondan uzaklaştırılması istenir. Daha sonra koşullar (pH, iyonik kuvvet, polarite gibi), tampon çözeltiler aracılığıyla kademeli olarak veya sürekli değiştirilir ve kolona bağlanan hedef proteinler bir fraksiyon toplayıcı aracılığıyla deney tüplerine toplanır (Akev, 2019).

2.5.1 Afinite kromatografisi

Moleküler tanımaya dayalı afinite kromatografisi, proteinlerin biyolojik özelliklerine göre ayrılmalarını sağlayan bir yöntemdir. Hedef protein, tamamlayıcı bir bağlayıcı madde (ligand) ile spesifik olarak ve geri dönüşümlü olarak bağlanır. Uygun bir ligand mevcut olduğunda afinite kromatografisi kullanılabilir. Kolon dolgu maddesine (matrise) hedef proteinle spesifik etkileşimi olan (örneğin, protein bir enzimse substratı veya kofaktörü) bir fonksiyonel grup (ligand) bağlanır. Hedef proteini içeren karışım kolona enjekte edildiğinde, protein biyospesifik ligandına bağlanarak kolona adsorbe olur. Daha sonra koşullar değiştirilerek adsorbe olan protein kolondan koparılır. Elüsyon, spesifik olarak rekabetçi bir ligand kullanarak veya spesifik olmayan bir şekilde (örneğin, pH, iyonik kuvvet veya polariteyi değiştirerek) gerçekleştirilir. (Akev, 2019; GE Healthcare, 2010).

Afinite kromatografisi antijen, antikor, enzim gibi protein yapısındaki moleküllerin saflaştırılmasında kullanılabildiği gibi karbonhidrat, vitamin gibi pek çok molekülün ayrılmasında da kullanılabilmektedir. Ayrıca belirli kirletici maddeleri uzaklaştırmak için de kullanılabilmektedir. Afinite kromatografisinin seçicilik özelliğinin yüksek olması sebebi ile hedef protein tek bir adımda saflaştırılabilmektedir. Bu kromatografi için kullanılan ligandların büyük bir çoğunluğu biyolojik kökenli olmasına rağmen, ayrımlar için farklı seçenekler sunan biyolojik kökenli olmayan doğal veya sentetik ligandlar da vardır. Kökenine bakılmaksızın bu moleküller yüksek seçicilik özellikli ve genel amaçlı düşük seçicilik özellikli olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yüksek seçicilik özelliği olan ligandlar (monospesifik) sadece bir veya birkaç yakın özellikteki bileşiği adsorbe ederken, genel amaçlı olan ligandlar (grup spesifik) ise yapısal olarak benzer molekülleri içeren grup bileşiklerini adsorbe ederek ayrımını sağlamaktadır (Konak vd., 2014).

2.5.2 Jel filtrasyon kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi uygun koşullar altında moleküler boyutta farklılık gösteren maddelerin ayrılmasını sağlar. Jel filtrasyon kromatografisi ayrıca ayırma mekanizmasını daha yakından tanımlayan boyut dışlama kromatografisi ("size exclusion chromatography", SEC) olarak da adlandırılır. Jel filtrasyon kromatografisi, protein saflaştırma veya numunenin iki ana gruba (büyük ve küçük molekül) ayrıldığı grup ayrımı için kullanılabilir. Grup ayırma genel olarak numunelerin tuzdan arındırılması ve tampon değişimi için kullanılır. Jel filtrasyon kromatografisi moleküllerin kolona bağlanmadığı bir yöntemdir. Jel filtrasyon kromatografisinin matrisinde doğal veya

sentetik polimerlerden faydalanılır. Polimerlerin çapraz bağlanarak üç boyutlu ağlar kurmasıyla jeller oluşturulur. Jellerde boncuk şeklinde gözenekler bulunur ve bu gözeneklerin boyutları çapraz bağlanma oranlarına bağlı olarak değişmektedir. Bu yöntemde büyük moleküller jellerdeki gözeneklerin içine girmeden boncuklar arasındaki boşluklardan geçerek ilerlerken, küçük moleküller gözeneklere girerek zaman kaybeder ve bir süre sonra çözücü tarafından sürüklenerek kolondan çıkarlar. Dolayısıyla önce büyük moleküller daha sonra küçük moleküller kolondan ayrılır. Jel filtrasyon kromatografisinde kolona enjekte edilen numunenin hacminin küçük olması ve saflaştırılan proteinin seyreltik ve çok hacimli bir hale gelmesi sebebiyle saflaştırma işleminin ardından örnek genellikle ultrafiltrasyon yöntemi ile konsantre edilir. Jel filtrasyon kromatografisi yönteminde genellikle birkaç kolon seri bağlanarak kullanılır ve elüsyon işleminin düşük basınçlar altında yapılması sebebiyle numuneyi saflaştırmak çok zaman alır. Bu yöntem, ultrafiltrasyon gibi ek işlemler gerektirebilmesi, saflaştırmanın uzun zaman alması ve bunlara bağlı olarak oluşan ek maliyetler sebebiyle endüstride pek tercih edilmez. Jel filtrasyon kromatografisi analiz amaçlı protein saflaştırılmasının ilk aşamalarında veya son aşamada protein konsantre ve küçük bir hacimdeyken bu yöntemden yararlanır (Akev, 2019; Konak vd., 2014).

2.5.3 İyon değişim kromatografisi

Proteinler yapılarında yer alan amino asitlerin yan zincirlerinde çözücüler ile etkileşimini arttıran ve çözünürlüğünü etkileyen yüklü gruplara sahiptir. Bu amino asitler negatif yüklü (aspartat, glutamat) veya pozitif yüklü (arginin, histidin, lizin) gruplara sahiptirler. Bir proteinin net yükü bu gruplar arasındaki dengeye ve pH değerine bağlı olarak değişmektedir. Belirli bir pH değerinde farklı proteinler, farklı net yüklere sahiptir. Proteinlerin ayırma işlemlerinde de bu yük farklılığından yararlanılmaktadır (Konak vd., 2014; Scopes, 2000; Sheehan ve Fitzgerald, 2008). Elektrostatik çekime bağlı olarak gerçekleşen iyon değişim kromatografisinde, kolon dolgu maddesine bağlı bulunan yüklü gruplar (ligand) ile zıt yüke sahip moleküller arasındaki tersinir adsorpsiyon gerçekleşmektedir. İyon değiştirici kolonun dolgu maddesi pozitif gruplar içeriyorsa, karşı iyonlar negatif olup bu tür iyon değiştiriciler anyon değiştiriciler adını alırlar. Benzer şekilde dolgu maddesi negatif gruplar içeriyorsa, karşı iyonlar pozitif olup bu tür iyon değiştiriciler katyon değiştiriciler adını alırlar. Yüklü moleküller kolona bağlandıktan sonra koşullar kademeli olarak veya sürekli değiştirilerek elüsyon gerçekleştirilir. İşlem koşulları, genellikle tuz konsantrasyonundaki artışlar veya pH değerindeki değişiklikler ile sağlanır (Akev, 2019; Haddad ve Jackson, 1990; Whitford, 2005)

İyon değiştiricilerin matrisinde genellikle modifiye edilmiş polisakkarit ve türevleri kullanılmaktadır. Örneğin iyon değiştirici kolonlarda en çok tercih edilen Sephadex matrisi

modifiye bir deksrandır. Çapraz bağlı bir agaroz olan Sepharose ve çapraz bağlı bir sellüloz olan Sephacel matrisleri de sıkça kullanılmaktadır. Ancak bir iyon değiştirici kolonda en önemli kısım ligand olarak da bilinen fonksiyonel gruplardır. Bu grupların özellikleri iyon değiştiricinin sınıfını ve gücünü belirler (örneğin, bkz.Tablo 1). Güçlü iyon değişim ligandları geniş pH aralıklarında yük özelliklerini ve bağlama kapasitelerini koruyabilirler. Zayıf iyon değişim ligandları ise değişen pH değerine bağlı olarak kapasitelerinde belirgin bir değişim gösterirler (Akev, 2019; Konak vd., 2014).

Tablo 1. İyon değişim ligandları ve fonksiyonel grupları (Konak vd., 2014)

Grup Adı	Türü	İyon Değiştirici	Fonksiyonel Grubu
Metil sülfonat (S)	Güçlü	Katyon	-O-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -O-CH ₂ -CHOH-CH ₂ SO ₃ ⁻
Sülfopropil (SP)	Güçlü	Katyon	-O-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ SO ₃ ⁻
Karboksimetil (CM)	Zayıf	Katyon	-O-CH ₂ -COO ⁻
Dördüncül amonyum (Q)	Güçlü	Anyon	-O-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -O-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -N ⁺ (CH ₃) ₃
Dördüncül aminoetil (QAE)	Güçlü	Anyon	-O-CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ -CH ₂ -CHOH-CH ₃
Dietilaminoetil (DEAE)	Zayıf	Anyon	-O-CH ₂ -CH ₂ -N+H(CH ₂ CH ₃) ₂

2.5.4 Hidrofobik etkileşim kromatografisi

Protein ve peptitlerin hidrofobik yapıdaki alifatik ve aromatik yan zincirleri ile sağlanan yüzey hidrofobisitesi, proteinlerin üç boyutlu yapısının stabilitesini sağlamanın yanı sıra proteinlerin enzim-substrat etkileşimleri gibi biyospesifik etkileşimlerin oluşmasına da yardımcı olmaktadır. Proteinlerin yapısına katılan standart 20 amino asitten 8 tanesi, polar olmayan R grupları içermelerine bağlı olarak hidrofobik özellik gösterir. Bu amino asitlerden fenilalanin, valin, lösin, izölösin ve metiyonin güçlü hidrofobik özellik gösterirken tirozin, alanin ve triptofan düşük hidfobik özellik gösterir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi, proteinleri hidrofobisite farklılıklarına göre ayırır. Ayırma, bir protein ve bir kromatografik ortamın hidrofobik yüzeyi arasındaki geri dönüşümlü etkileşime dayanır. Genellikle amonyum sülfat ile çökeltilmiş veya iyon değişim kromatografisi sonrasında yüksek tuz içeren proteinlerin sonraki saflaştırma

adımı olarak kullanılır. Proteinin hidrofobisitesini artırmak için çözeltiye tuz ilavesi yapılır. Tuz, proteinin etrafındaki su moleküllerini çekerek hidrofobik grupların etkileşmesine yardımcı olur. Dolayısıyla bu kromatografi yönteminde iyonik gücü yüksek çözeltilerde proteinler çözündürülerek kolona uygulanırlar ve kolondan geçerken hidrofobik etkileşimle kolona tutunurlar. Koşullar daha sonra kademeli olarak değiştirilir, böylece bağlı maddeler farklı hidrofobisitesine göre ayrılır. Elüsyon, genellikle tuz konsantrasyonundaki düşüşlerle gerçekleştirilir. Yüksek oranda hidrofobik proteinler, hidrofobik ligandlara sıkıca bağlanır ve kolondan en son çıkarlar. Matris olarak genellikle çapraz bağlı bir agaroz olan Sepharose ve ona bağlı gruplar olarak eter, izopropil, butil, oktil, fenil ligandları kullanılır (Akev, 2019; GE Healthcare, 2010).

2.5.5 Ters faz kromatografisi

Ters faz kromatografisi, proteinleri hidrofobik özelliklerine göre saflaştırır. Ters faz kromatografisinde sabit faz, mobil faza kıyasla daha hidrofobiktir. Numune bileşenleri, kromatografi kolonuna yüklendiklerinde kolona adsorbe olur. Koşullar daha sonra değiştirilir, böylece bağlı maddeler farklı olarak ayrılır. Ters faz matrislerinin doğası gereği, bağlama genellikle çok güçlüdür. Bağlanma, organik çözücüler ve diğer katkı maddelerinin (iyon eşleştirme ajanları) kullanılmasıyla düzenlenebilir. Elüsyon genellikle organik çözücü konsantrasyonundaki artışla gerçekleştirilir. Asetonitril, metanol, etanol ve propanol en yaygın kullanılan organik çözücülerdir. Kullanılan ligandlar; C4, C8 ya da C18 n-alkil hidrokarbonlardır. Proteinler, kromatografi kolonuna kuvvetle bağlanma ve denatüre olma eğilimindedir. Çoğu zaman kolondan koparılmaları çok zor olabilmektedir. Pek çok protein organik çözücüler tarafından denatüre edildiğinden, aktivitenin geri kazanılması ve doğal üçüncül yapı genellikle tehlikeye girer. Bu yöntem aktivite ve üçüncül yapı önemsenmediği durumlarda, saflık kontrolü analizlerinde yaygın olarak kullanılır (GE Healthcare, 2010; Ünlüsayın vd., 2009).

2.6 Bitkisel Proteinlerin Genel Özellikleri

Proteinler sahip oldukları çeşitli fonksiyonel özellikler ile gıda formülasyonlarında çokça yer alırlar (Kanu vd., 2007). Proteinlerin fonksiyonel özellikleri gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmalarını sağlayan; gıdaların depolanması, işlenmesi ve tüketilmesi esnasında gıdanın performansını yöneten fizikokimyasal özelliklerdir (Lamsal, Jung ve Johnson, 2007). Su tutma ve köpük bağlama, yağların emülsiyonu, aroma tutma, çözünürlük ve jelleşme özellikleri bu fonksiyonel özelliklerdendir (Rodsamran ve Sothornvit, 2018). Yüksek protein içeriği, fonksiyonel etkinlik, anti-beslenme faktörü düşüklüğü (fitik asit vb.) içeriklerinden dolayı protein ekstraktlarının gıda sanayinde kullanılması giderek artmaktadır (Singharaj ve Onsaard, 2015). Protein özütleri şekerleme, kozmetik atıştırıcılık, et ürünleri, gazsız içecekler gibi birçok üründe aroma

artırıcı ve gıdayı zenginleştirici bileşen olarak kullanılmaktadır (Bandyopadhyay ve Ghosh, 2002).

Gıda üretiminde kullanılmak için yetiştirilen ham maddelerin esansiyel mineral ve vitaminleri günümüzde daha düşük oranda içerdiği ve bu durumun gittikçe artan dünya nüfusunu beslemek düşüncesiyle yürütülen hatalı tarım uygulamaları dolayısıyla ortaya çıktığı belirtilmektedir (Sikiric vd., 2003). Protein bakımından yetersiz beslenme önemli sağlık sorunlarını beraberinde getirmektedir (Ghaly ve Alkoaik, 2010). Beslenme eksikliğinde vücuttaki proteinin enerji için kullanılması durumunda vücut daha sonra diğer besin öğelerini (karbonhidrat, yağ) enerji kaynağı olarak temin edebilse de kaybedilen proteinin vücuda tekrar kazandırılması söz konusu olmamaktadır (Pimentel vd., 1975). Özellikle çocuklarda protein eksikliği, büyüme bozukluklarına ve hastalıklarda artışa sebep olmaktadır (Pimentel vd., 1975). Bununla beraber tüm dünyada 500 milyondan fazla insanın protein bakımından yetersiz beslendiği belirtilmektedir (Dando, 2012).

Sekiz esansiyel amino asidi daha yüksek oranda içermeleri ve biyoyararlılıklarının daha fazla olması bitkisel proteinlere göre hayvansal proteinlerin besleyici özelliklerinin daha yüksek olmasını sağlamaktadır (Pimentel vd., 1975). Örneğin; mısır, buğday ve pirinç düşük miktarlarda lizin içermektedir (Pimentel vd., 1975). Genel olarak bitkisel proteinlerin lizin ve metiyonin esansiyel amino asitlerini düşük miktarda içerdiklerini söylemek mümkündür (Pimentel vd., 1975). Bitkisel proteinlerin, referans protein kaynağı (tavuk yumurtası) ile karşılaştırıldığında, bu kaynağın esansiyel amino asitleri % 62-81 oranında içerdiği belirtilmektedir (Krajcovicova-Kudlackova, Babinska ve Valachovicova 2005). Bununla beraber; hayvansal gıdalara nazaran daha az araştırılan bitkisel gıdalar da protein ürünleri içermektedir (Garcia vd., 2013). Bitkisel proteinlerin esansiyel amino asitler bakımından zengin olarak üretilmesi ekonomik açıdan oldukça önem taşımaktadır (Young ve Pellett, 1994). Protein hidrolizatlarından elde edilen kısa zincirli peptitlerin vücut tarafından etkin bir şekilde değerlendirildiği ve besleyici özelliklerinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Gao, Smith ve Tsompo, 2014).

Küresel olarak ekonomik problemlerin artması, dini ve etik sınırlamalar, vejetaryenlik ve veganlık eğilimlerinin artması, sağlık endişeleri dolayısıyla hayvansal protein kullanmayan tüketici gruplarını kapsaması, besleyici içeriğe sahip olması, ucuz ve kolay ulaşılabilir olması gibi nedenler son zamanlarda gıda endüstrisinde hayvansal proteinlere alternatif olarak bitkisel proteinlerin kullanılmasını gündeme getirmektedir (Rodsamran ve Sothornvit, 2018). Proteinlerin sağlıklı yaşam için gerekliliğiyle beraber dünya nüfusunun artışı yeni alternatif protein kaynaklarını da gerekli kılmaktadır (Çetiner

ve Bilek, 2018). Büyüyen dünya nüfusu bitkisel proteinlerin daha verimli kullanılmasını zorunlu hale getirmektedir (Day, 2013). Hayvansal kaynaklı gıdaların yüksek miktarda tüketilmesinin bazı sağlık problemlerine neden olduğu belirtilmektedir (Pimentel vd., 1975). Örneğin; serum kolesterolünün yüksek olması ile ilişkilendirilen koroner kalp hastalığı riskinin hayvansal kaynaklı gıdaların yüksek miktarda kolesterol ve doymuş yağ asidi içermesi ile ilişkilendirildiği bilinmektedir (Pimentel vd., 1975). Aynı zamanda bitkisel proteinlerin serum kolesterolünü düşürdüğü bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Jenkins vd., 2000). Alternatif protein kaynaklarının keşfedilmesinde bir diğer etken olan jelatin, BSE gibi hayvansal kaynaklı proteinlere olan güvenin azalması da sürdürülebilir bir diyetle geçişi beraberinde getirmektedir (Aiking, 2011). Dolayısıyla, bitkisel protein kaynaklarının çeşitliliği nedeniyle hayvansal proteinlere iyi bir alternatif olduklarını söylemek mümkündür (Moure vd., 2006).

Günümüzde dünya nüfusunun protein ihtiyacının %70'i bitkisel kaynaklardan sağlanmaktadır (Rodsamran ve Sothornvit, 2018). Aynı miktarda bitkisel ve hayvansal protein üretmek için gerekli olan ekim alanı dikkate alındığında bitkisel protein yetiştirmek için toprağın % 10'u gibi daha az bir oranı gerekmektedir (Day, 2013). Ayrıca hayvansal proteinlerin üretimi eşit miktarda bitkisel protein üretiminden yaklaşık olarak 100 kat daha fazla su gerektirmektedir (Pimentel ve Pimentel, 2003). Dolayısıyla, sürdürülebilirlik bağlamında da bitkisel proteinlere yönelik ilgi her geçen gün artmaktadır (Rodsamran ve Sothornvit, 2018).

Bitkisel protein kaynaklarının iki temelini tahıllar ve yağlı tohumlar oluşturmaktadır (Erickson, 2015). Yağ endüstrisinden elde edilen yağı alınmış protein kaynaklarına özel bir ilgi gösterilmiştir ve ayçiçeği, kanola ve kolza tohumu gibi yağlı tohumların küspelerinden elde edilen proteinlerin biyoaktif ve fonksiyonel özellikleri üzerine araştırmalar yapılmıştır (Aydemir vd., 2014.). Yağı alınmış tohumların küspelerinde % 35-60 oranları arasında değişen miktarlarda protein bulunmaktadır ve tahıllar yağlı tohumlara göre % 10-12 daha az oranda protein içermektedir (Erickson, 2015). Ancak tahılların üretim miktarının yağlı tohumlara göre daha fazla olması onları oldukça önemli bir bitkisel protein kaynağı haline getirmektedir. Doğada bolca bulunmaları nedeniyle bitki yaprakları ve bitkiler üzerinde yaşayan algler de bitkisel proteinlere kaynak olma açısından oldukça önemlidir (Erickson, 2015). Yağlı tohumların küspelerinden elde edilen proteinlerin yanı sıra alternatif fonksiyonel protein kaynakları olarak değerlendirilmek üzere yer fıstığı küspesi ve hurma meyvesi unu proteinlerinden biyoaktif, yenilebilir film yapımı ve fonksiyonel özellikleri üzerine çalışılmıştır (Aydemir vd., 2014).

Tahıllar, bakliyatlar, yeşil sebzeler ve yağlı tohumlar bitkisel protein kaynaklarıdır (Çetiner ve Bilek, 2018). Çeşitli bitkisel kaynaklardan protein eldesine yönelik çalışmaların giderek hız kazanmasıyla beraber bitkisel protein kaynağı olarak günümüzde yaygın kullanılan bitki soyadır (Nguyen ve Dao, 2017). Soya fasulyesinden elde edilen protein izolatları, konsantreleri ve hidrolizatları; et ve süt ürünleri, bebek formülasyonları, fonksiyonel gıdalar ve nutrasötikler gibi gıda endüstrisinin farklı alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Aydemir vd., 2014.). Soya proteini dünyada en yaygın olarak kullanılan bitkisel protein olmakla beraber buğday gluteni, kolza, pamuk, mısır, yer fıstığı ve ayçiçeği proteinleri de yaygın bir şekilde kullanılan bitkisel protein kaynaklarıdır; kinoa ve cevizden elde edilen bitkisel proteinler de mevcuttur (Nguyen ve Dao, 2017; Moure vd., 2006).

Bezelye, yetiştirilme alanının geniş olması ve kabuğunun kolay bir şekilde ayrılabilmesi gibi nedenlerden dolayı bakliyatlar arasında ticari olarak en çok kullanılan bitkisel proteindir (Day, 2013). Bezelye proteinlerinin % 65-80'lik kısmını oluşturan legumin (11S globülin) ve visilin (7S globülin) depo proteinleri, yüksek emülsifiye edici özellik göstermektedirler (Liang ve Tang, 2013). Bezelye proteinlerinin sahip olduğu yüksek fonksiyonellik özellikleri birçok alanda kullanılmalarını sağlamaktadır (Sandberg, 2011). Örneğin; bezelye ve yulaf proteini izolatu ile üretilen krakerlerin, ticari olarak üretilen krakerlere göre besleyici ve dokusal özelliklerinin daha iyi olduğu belirtilmektedir (Morales-Polanco vd., 2017). Bununla beraber yağlı alınmış ayçiçeği posası ve pirinç kepeği gibi yan ürünlerden protein eldesi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Hourigan vd., 1997).

Bitkisel proteinler gıdaların besin değerlerinin zenginleştirilmesi, fonksiyonel gıda ve gıda takviyesi üretimi ve aroma artırıcı olarak kullanılabilmesi ile ticari olarak kullanılan peynir altı suyu proteinlerine alternatif oluşturmaktadır (Clemente, 2000). Bitkisel kaynaklı proteinler; besin değerleri, biyolojik etkinlikleri, emülsifiye edici aktiviteleri, köpük ve jel oluşturmaları, yağ, su ve lezzet bağlayıcılıkları gibi birçok farklı nedenden dolayı gıda sistemlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca bitkisel proteinler iyi film oluşturma özellikleriyle yenilebilir film ve plastik ambalaj malzemelerine alternatif olarak biyolojik olarak parçalanabilen ambalaj malzemelerinin geliştirilmesinde potansiyel malzemelerdir (Aydemir vd., 2014).

Tarımda üretilen proteinin % 35'i gıda olarak kullanılırken kalan protein yem olarak ya da diğer sektörlerde kullanılmaktadır; bir kısmı ise hiç kullanılmamakta ve atığa dönüşmektedir (Sari vd., 2015). Bitkisel protein pazarının hızla büyümesi nedeniyle yağlı tohumlar, meyve ve sebzeler, tahıllar ve soyaya alternatif baklagiller ve bunların

işlenmesiyle oluşan atıkların ticari protein kaynağı olarak değerlendirilmesinde büyük bir rekabet vardır (Aydemir vd., 2014.). Gıda endüstrisi; bitkisel proteinleri kullanarak yeni ürünlerin geliştirilmesi, gıdaların muhafazası ve atıkların azaltılması konularında araştırmalar yaparak sürdürülebilir bir geleceğe de katkıda bulunabilir (Aiking, 2011). Bu nedenle hem yüksek miktarlarda bitkisel protein üretmek hem de israfı önlemek için ileri atık değerlendirme araştırmalarının yapılarak bulguların hayata geçirilmesi hem ülkemiz hem de global popülasyon açısından önemlidir.

2.6.1 Yağlı tohum proteinleri

Yağlı tohum proteinleri insan beslenmesinde genellikle birincil protein kaynağı olarak kullanılmamaktadır (Arntfield, 2000). Bununla beraber, yağlı tohumların önemli miktarda olan protein içermeleri dolayısıyla insan beslenmesi için kullanım potansiyelleri bulunmaktadır (Moure vd., 2006). İçeriği nedeniyle en çok kullanılan ve bilinen bitkisel protein soya proteini olmakla beraber; ayçiçeği, kanola, mısır, aspir, yer fıstığı, susam, pamuk ve keten tohumu proteinleri kullanılan diğer yağlı tohum ürünleridir (Rodrigues, Coelho ve Carvalho, 2012).

Yağlı tohum proteinlerini; biyolojik olarak aktif proteinler ve yağlı tohumlardaki en önemli proteinler olan yapısal ya da depo proteinleri olmak üzere iki sınıfta incelemek mümkündür (Arntfield, 2000). Yapısal proteinler insan beslenmesi açısından oldukça önemli olan proteinlerdir. Biyolojik olarak aktif proteinlere enzimler örnek gösterilebilir. Yağlı tohumların içerdiği depo proteinlerine ise cruciferin/12S protein, zein, 11S protein, arachin, carmin, α -globulin, glycinin ve helianthin örnek gösterilebilir (Hüriyet, 2014).

Yağlı tohumların protein miktarı değişmektedir; soyanın protein içeriği % 37 iken aspride % 13-17 oranında protein bulunmaktadır. Ancak yağlı tohum proteinleri birbirine yapısal benzerlikler göstermektedir. Buna örnek olarak hasat edilen tüm yağlı tohumların içeriğinde suda çözünen albuminlerin, tuzda çözünen globulinlerin ve alkalide çözünen glutenlerin bulunması ve dört adet aynı protein fraksiyonunu içermeleri gösterilebilir (Moure vd., 2006; Rodrigues, Coelho ve Carvalho, 2012).

Yağlı tohumların dünya bitkisel protein ihtiyacını karşılama oranları; soya için % 69, kolza için % 12.4, pamuk çiğidi için % 6.9, ayçiçeği tohumu için % 5.3, yer fıstığı için % 2.8 olarak belirtilmektedir (Moure vd., 2006). Küresel olarak soğuk presleme ile yağ üretiminin giderek artmasıyla yağlı alınmış bitki posaları birikmekte ve bu durum sonuç olarak yağlı tohum posalarından bitkisel protein ürünlerinin üretilmesine yol açmaktadır (Çakır ve Gülseren, 2019).

2.6.2 Bitkisel proteinlerin ekstraksiyonu

Bitkisel proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri üzerine çalışılabilmesi için proteinin diğer proteinlerden ve protein olmayan moleküllerden ayrılması gerekmektedir. Proteinlerin kendine özgü olan amino asit bileşimi ve yüzey hidrofobikliği gibi özellikleri nedeniyle farklı ekstraksiyon yöntemleri farklı protein izolatlarını ya da konsantrasyonlarını vermektedir (Karaca, Low ve Nickerson, 2011). Gıda yan ürünlerinden, uygun özütlenme/çöktürme yöntemleri ile protein ekstraktları üretilmektedir. Alkali ekstraksiyonu/izoelektrik çökeltme, asit ekstraksiyonu, su ekstraksiyonu, tuz ekstraksiyonu ve ultrafiltrasyon metotları bitkisel atık posalarından proteinlerin ekstraksiyonu için kullanılan yöntemlerdir (Boye vd., 2010). Bitkisel proteinlerin çoğu alkali ortamda çözüldüğünden dolayı alkali ortamda süpernatanttan protein ekstraktı elde edilmektedir (Escamilla-Silva vd., 2003). Ancak alkali yöntem ile düşük verimli protein eldesi sağlandığı için izoelektrik noktada çöktürme ile proteinleri süpernatanttan ayırma işlemi de sıklıkla uygulanmaktadır (Rodsamran ve Sothornvit, 2018).

Yeni teknolojilerin kullanılmasının protein ekstraksiyonunda verimi artırdığı belirtilmektedir (Sarkis vd., 2015). Gıda atıklarından protein ekstraksiyonunda verimi artırmak için alkali yöntem dışında enzim, ultrases, mikrodalga, vurgulu elektrik alan ve süperkritik akışkan gibi yaklaşımlar da bulunmaktadır (Görgüç, 2018). Bu yöntemler ekstraksiyon işleminin süresini azaltmakta, ürün kalitesini artırmakta ve Maillard tepkimelerini de kontrol altında tutmaktadır (Ohshima, Sato ve Saito, 1995).

Mikrodalga ile ekstraksiyon yönteminde; bitkinin hücre matrisinde bulunan su, mikrodalga enerjisini absorbe ederek hücrenin içten ısınmasını ve hücre yapısındaki bileşenlerin matris dışına geçişini hızlandırarak hücrenin parçalanmasını sağlamaktadır (Wang ve Weller, 2006). Bu yöntemde çözücü tipi, mikrodalga gücü, işlem süresi ve sıcaklık ekstraksiyon performansını etkileyen parametrelerdir (Madej, 2009). Mikrodalga ile ekstraksiyon susam, elma, pirinç kepeği ve kabak çekirdeği gibi farklı materyallerde çalışılmıştır (Jiao vd., 2014). Ultrafiltrasyon yönteminde proteinler partikül büyüklüğü ya da molekül ağırlıklarına göre diğer maddelerden ayrılmaktadır (Romero-Baranzini vd., 1995). Vurgulu elektrik alan yönteminde hücre membranlarına kritik elektriksel potansiyel uygulanarak dokunun parçalanması ve geçirgenliği artırılıp proteinlerin hücre dışına aktarılması hızlandırılmaktadır. Yüksek voltaj ile ekstraksiyon yönteminde, iki elektrot arasında üretilen yüksek voltajlı elektriğin boşalmasıyla birlikte bitkisel dokuya yoğun bir enerji akışı sağlanmakta ve böylece kütle transferi hızlanmaktadır (Rosello-Soto, vd., 2015).

Ultrases yönteminde, 20 kHz ve 1 GHz aralığında frekansa sahip olan ses dalgaları sayesinde bitki hücresinin duvarı etkilenmekte ve matriste bulunan bileşenlerin hücre dışına geçişi hızlanmaktadır (Alupului, Calinescu ve Lavric, 2009). Ultrases dalgalarının oluşturduğu ultrasonik enerji, sıvı ortama geçerek iç basıncı artırmakta ve küçük kabarcıkların oluşumunu hızlandırmaktadır. Küçük kabarcıkların patlamasıyla kabarcıkların iç yüzeyi çok yüksek sıcaklık ve basınç değerlerine ulaşmakta ve hedef bileşenin matriksten salınmasını sağlamaktadır (Jambrak vd., 2009). Ultrases teknolojisinin gıda endüstrisine entegre edilmesiyle bitkisel kaynaklardan yüksek katma değerli biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu yaygınlaşacaktır (Görgüç, 2018).

Enzimatik ekstraksiyon yönteminde; özellikle karbohidrazlar (selülaz, pektinaz) ile bitkisel kaynaktaki polisakkarite bağlı olan proteinler serbest duruma geçirilerek ekstraksiyon verimi artırılmaktadır (Hourigan vd., 1997). Karbohidrazlar dışında alkalaz, flavorzim ve protizim gibi proteaz enzimlerinin de ekstraksiyon verimini artırmak amacıyla kullanıldığı belirtilmektedir (Hanmoungjai, Pyle ve Niranjana, 2001). Ekstraksiyon işleminin daha düşük sıcaklıkta gerçekleşmesi, patlayıcı çözücü kullanılmaması ve zararlı atık madde üretilmemesi bu yöntemin diğer avantajlarıdır (Hanmoungjai, Pyle ve Niranjana, 2001). Bitkisel proteinler enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile elde edildiklerinde düşük viskozite ve yüksek çözünürlük özelliği gösterdikleri için fonksiyonel bir bileşen olarak birçok gıda ürünüde kullanılmaktadır (Adler-Nissen, 1979). Farklı bitkisel kaynaklardan protein ekstraksiyonunda; karbohidrazlardan viskozim L'nin, proteazlardan ise alkalaz enziminin en verimli enzimler olduğu belirtilmektedir. Viskozim L, arabanaz, selülaz, ksilanaz ve hemiselülaz gibi birden fazla karbohidrazı içermektedir (Hourigan, vd., 1997).

2.7 Fındığın bileşimi

Fındık, çalı formunda kendine has bir iklimde yetişen uzun ömürlü bir kültür bitkisidir (Başaran, 2015). Fagales takımının *Betulaceae* familyasının *Coryleae* alt familyasının, *Corylus* cinsine girmektedir. Ekonomik olarak kültürü yapılan önemli türleri; *Corylus avellana* L., *Corylus colurna* L. ve *Corylus maxima* Mill. olarak sıralanmaktadır (Ceran, 2018).

Japonya'dan başlayarak Çin, Kafkasya, Türkiye, Avrupa ve Kuzey Amerika'ya kadar olan Kuzey yarım kürenin ılıman kuşağı bölgesinde yetişmektedir (Sobutay, 2006). Antik Çağda fındık meyvesi "pontik" olarak bilinmiştir. Adını Karadeniz'in ismi olan "Pont Exinus" teriminden almaktadır. Doğu Karadeniz'den Akdeniz, Ortadoğu ve Avrupa ülkelerine yayıldığı düşünülmektedir (Savran, 2014).

Ustaoğlu (2012) makalesinde fındığın yetişme koşulları şöyle özetlenmiştir:

“Fındık, ılıman iklimlerde bulunan ve nemli ılıman iklime sahip bölgelerde yetiştirilen bir meyve türüdür. FAO ve FİSKOBİRLİK verilerine göre, toplam hasat bağlamında Türkiye, İtalya, İspanya ve ABD başlıca üreticilerdir. Türkiye'nin Karadeniz kıyı kesimlerinde, İtalya'nın Adriyatik kıyılarındaki, İspanya'nın Katalonya bölgesinde ve ABD'nin Oregon bölgesinde elverişli bir yaşam alanı bulur. Öte yandan yarı nemli iklime sahip bölgelerde yetiştirilmesi mümkün olsa da yağış eksikliği nedeniyle sulamaya ihtiyaç duymaktadır. İklim koşulları açısından elverişli özelliklere sahip olan Karadeniz kıyı şeridi, fındığın doğal yaşam alanıdır ve bu bölgelerin doruk bitkisi fındıktır. Bu kıyı şeridi boyunca 750 m yüksekliğe kadar tarım arazilerinde ekonomik olarak yetiştirilebilir. Bu tarım arazileri, deniz seviyesinden yüksekliklerine göre üç bölgeye ayrılmıştır: 1.) “kıyı bölgesi”, (0 - 250 m), 2.) “orta bölge”, (251 - 500 m) 3.) , “Yüksek bölge” (501 - 750 m). Bu bölgelerden ilki, ekim için en uygun koşullara sahiptir. Yükseklik ne kadar fazlaysa verim o kadar az olur. 750 m'nin üzerinde değişen iklim koşulları fındık ekimini sınırlamaktadır.”

Ayrıca, FİSKOBİRLİK verilerine göre, fındık ağacı yeryüzünde, 36°-41° kuzey enlemlerinde ve kendine özgü iklim koşullarında yetişir ve kıyılardan en çok 30 km içeride ve yüksekliği 750-1000 metreyi geçmeyen yerlerde ürün verir. Türk fındığı, kalite olarak Giresun ve Levant olmak üzere ikiye ayrılır. **Giresun kalite fındık**, tadı ve içerdiği yağ oranı ile yeryüzünün en üstün özellikli fındığıdır. Giresun ile Trabzon'un Beşikdüzü, Vakfıkebir ilçelerinde yetişir. **Levant kalite fındık**, daha az yağ içerir. Trabzon ve bir bölümü ile Ordu, Samsun, Bolu, Sakarya, Zonguldak ve Bartın illerinde yetişir.

Fındığın anavatanı hakkında birçok tarihçi ve yazarın farklı görüşleri olmasına rağmen arkeolojik kazılar ışığında MÖ 10000'li yıllarda fındığın mezolitik diyetlerin bir parçası olduğu görülmektedir. Aynı zamanda fındık Çin yazılı kaynaklarında M.Ö. 2838 yıllarında Tanrı'nın insanlara armağan ettiği beş kutsal meyveden biri olarak bildirilmekte ve yetiştiriciliğinin yapıldığı ifade edilmektedir (Savran, 2014). Fındığın önemli bir uluslararası ticaret malı olarak satışına ait ilk yazılı kaynak 1403 yılına aittir. Türk fındığı, Avrupa ve Amerika pazarlarına 1782 yılından sonra ihraç edilmeye başlanmıştır (Tüfekçi, 2018).

Türkiye'de bazı özellikleri birbirinden farklı olan birçok fındık çeşidi yetiştirilmektedir. Bunlar; Tombul, Palaz, Çakıldak, Kara, Fosa, Mincane, Uzunmusa, Kan, Kargalak, Cavcava, Sivri, Acı, Kuş, Yuvarlak Badem ve Yassı Badem olarak sıralanmaktadır (Özdemir ve Akıncı, 2004). Türk Fındıkları kalitelerine göre ise Giresun ve Levant kalite



olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Giresun ilinin tamamında yetiştirilen “Tombul Fındık” dünyanın en üstün özelliklere sahip fındığı olarak bildirilmiştir. Dünyadaki fındık çeşitleri içinde en yüksek oranda zar atan fındıktır (Köksal vd., 2006).

Dünya fındık üretiminin yaklaşık olarak %70’lik payını elinde tutan Türkiye en önemli fındık üreticisi ülkedir. Son on yıllık ortalamaya göre 550.000 tonluk fındık üretimi gerçekleştirmektedir. Türkiye, 38 tanesi Avrupa kıtasına ait olmak üzere toplamda 112 farklı ülkeye 2017 yılında fındık ihraç etmiştir. Fındık ihracatımızda en önemli ticari ortaklarımız Avrupa Birliği ülkeleri olmaktadır. Almanya başta olmak üzere İtalya, Fransa ve Kanada, Türkiye’nin en fazla ihracat yaptığı ülkelerdir (Tablo 2) (TİM, 2018).

Ülkemiz için önemli bir ihraç ürünü olan fındık doğal halde, kavrulup veya beyazlatılarak tüketilmektedir. Aynı zamanda fındık ezmesi, un, yağ ve kırılmış fındık gibi kendi ürünleri mevcuttur. Dünya genelinde çikolata ve şekerleme ürünleri başta olmak üzere sütte, pastacılıkta ve fırıncılıkta kullanılmaktadır (Başaran, 2015).

Tablo 2. Türkiye’nin 2017 fındık ihracatı rakamları (TİM, 2018).

Ülke	Miktar (kg)	Değer (\$)
Almanya	63.542.587	437.635.314
İtalya	54.434.372	364.598.678
Fransa	22.859.283	158.843.915
Kanada	11.380.872	78.728.862
Polonya	10.215.735	73.789.361
Hollanda	10.128.313	71.794.111
İsviçre	10.089.163	71.140.643
Avusturya	8.886.394	64.468.638
Belçika	8.673.888	58.972.974
Çin	7.307.265	55.488.983
İspanya	5.776.768	39.642.635
Birleşik Devletler	5.216.062	36.943.425
Birleşik Krallık	5.044.199	37.921.665
Avustralya	3.178.747	22.076.601
Rusya Federasyonu	3.112.064	23.781.855
Brezilya	2.514.145	15.578.181
Irak	2.514.145	15.578.181
Diğerleri	37.749.290	241.384.978
Toplam	269.623.292	1.868.369.000

Fındık, istenilen tatları oluşturmanın yanı sıra insan beslenmesinde ve sağlığında besin öğelerinin çeşitliliği ve zenginliği bakımından önemli bir meyvedir. Ana bileşeni yağ olmasına rağmen protein miktarı da oldukça yüksektir. Fındıkta (%g/g cinsinden) % 50-73 yağ, % 10-12 karbonhidrat, % 10-24 protein, % 2-4 rutubet, % 1-3 selülozik bileşikler ve pektin, % 2-3 kül içermektedir. Aynı zamanda 1 kg fındığın 6000-6500 kilokalorilik bir enerji değerine sahip olduğu bilinmektedir (Köksal vd., 2006; Garcia vd., 1994). Köksal vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada Türk fındık çeşitlerinin bileşimleri kapsamlı olarak araştırılmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Türkiye’de yetiştirilen farklı fındık çeşitlerine ait nem, yağ, kül, protein miktarları (% g/g cinsinden) (Köksal vd., 2016).

Çeşit	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

2.8 Fındık proteinleri

Fındığın protein içeriği, yumurta ve tahıllardan yüksek olduğu, aynı zamanda et ve kuru baklagillerin ihtiva ettiği protein miktarı ile karşılaştırılabilir olduğu bildirilmiştir (Ceran, 2018). Türk fındık çeşitlerinde dünyadaki diğer fındık çeşitlerine kıyasla daha yüksek oranlarda glutamik asit, arginin ve aspartik asit bulunmaktadır (Çiftçi, 2018). Fındık proteininin insan vücudu için elzem olan tüm amino asitlerini içerdiği sindirilebilirliğinin ise %80-90 arasında değiştiği bildirilmiştir (Özdemir, 1997).

Fındık, yağı alındıktan sonra geriye kalan posasında yüksek miktarda protein içermektedir (%35-40). Bu proteinler yağ ve su absorpsiyonu, emülsifikasyon, köpürme kapasitesi gibi özellikleri sebebiyle gıda proseslerinde önemli bir yere sahiptir (Tatar vd. 2013). Aynı zamanda, elde edilen bu proteinlerin ve yapısında bulunan peptitlerin biyoaktif özellikleri üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Aydemir vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada, fındık posalarından farklı yöntemlerle ekstrakte edilen (normal ekstrakte edilmiş, sıcak ekstrakte edilmiş, asetonla yıkanmış ve kombinasyonları) protein konsantrelerinin biyoaktif, fonksiyonel ve yenilebilir film yapma özellikleri araştırılmıştır. Bu protein konsantrelerinde antioksidan aktivite (TEAC ve ORAC: 158-461 mmol Trolox/kg), demir şelasyonu (60.7-126.7 mmol EDTA/kg), anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibisyonu (IC₅₀: 0.57-1,0 mg/ml) ve kolon kanseri hücrelerinde antiproliferatif aktivite (IC₅₀: 3.0- 4,6 mg/ml) görülmüştür. Bu çalışmaya göre HPC-AW-H (aseton ile yıkanmış ve sıcak ekstrakte edilmiş) şeklinde adlandırılmış protein konsantresi en yüksek biyoaktif etkiler göstermiştir.

Liu vd. (2018a) tarafından Asya yabani fındık (*Corylus heterophylla* Fisch.) proteinlerinde ACE inhibe edici peptitler araştırılmıştır. Sırasıyla iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanarak saflaştırılan peptitler, sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyonu-tandem kütle spektrometresi (LC-ESI-MS/MS) ile tanımlanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre Ala-Val-Lys-Val-Leu, Tyr-Leu-Val-Arg ve Thr-Leu-Val-Gly-Arg dizilimine sahip yeni ACE inhibe edici peptitler belirlenmiştir. Bu peptitlerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 73.06, 15.42 ve 249.3 µM olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Liu vd. (2018b) önceki çalışmasında elde ettiği, C2 şeklinde isimlendirilmiş fraksiyondan antioksidan aktivite gösteren altı yeni peptit tanımlanmış ve bu peptitler sentetik olarak elde edilerek antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Bu peptitlerin amino asit dizileri 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 bildirilmiştir. Bu 6 sentetik peptidin tümü antioksidan aktivite göstermiş ve bunlar arasında Ala-Asp-Gly-Phe peptiti en yüksek ABTS radikal süpürme aktivitesi ve DPPH

radikal süpürme yeteneğini sergilemiştir. Bu nedenle, yabani fındık proteini hidrolizatlarından izole edilen peptitlerin, gıda ve ilaç endüstrisinde potansiyel antioksidanlar olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür.

2.9 Çörek Otunun Bileşimi ve Fonksiyonel Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Çörek otu, Ranunculaceae familyasının *Nigella sativa* türüne ait olan tek yıllık otsu bir bitkidir (Gharby vd., 2015). Çörek otu tohumları ağırlıkça yaklaşık olarak % 21 protein, % 35 karbonhidrat ve % 35-38 oranında yağdan oluşmaktadır (Baydar, 2009). Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve güneybatı Asya'ya özgü olmakla beraber Hindistan, Pakistan, Suriye, Türkiye ve Suudi Arabistan gibi dünyanın pek çok ülkesinde yetiştirilmektedir (Ahmad vd., 2013). Emtia Ticaret İstatistikleri Veritabanına göre çörek otunun küresel tüketiminin 187.000 ton olduğu tahmin edilmektedir (Coşkun vd., 2019). Çörek otunun küresel üretiminin % 85'inden fazlasını Hindistan gerçekleştirirken, % 3.5'i Suriye ve % 2.8'i Türkiye tarafından üretilmektedir (Anonim, 2014).

N. sativa dünya çapında yaygın olarak kullanılan şifalı bir bitki olmakla beraber Unani ve Tibb, Ayurveda ve Siddha gibi çeşitli geleneksel tıp sistemlerinde de oldukça popülerdir. *N.sativa*'nın tohum ve yağı üzerine çeşitli ilaç ve gıda sistemlerinde geleneksel halk tıbbında uzun bir geçmişi bulunmaktadır (Ahmad vd., 2013). Çörek otu en az 2000 yıldır geleneksel ve doğal bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Çakır ve Gülseren, 2019). Dolayısıyla sağlık alanında en zengin geçmişe sahip olan bitkilerden olduğunu söylemek mümkündür (Ermumcu ve Şanlıer, 2017). İslam literatüründe ise şifa tıbbının en önemli formlarından biri olarak kabul edilmektedir (Ahmad, 2013). Tıp tarihinin en ünlü kitap yazarlarından olan İbn-i Sina, çörek otunun metabolizmayı uyararak vücut enerjisini düzenlediğini ve halsizliği önlediğini belirtmiştir (Ayhan, 2012).

Siyah tohum ve kara kimyon olarak da bilinen çörek otu Orta Doğu ülkeleri ve dünyanın diğer birçok ülkesinde astım, bronşit, diyare, baş ağrısı, romatizma, hipertansiyon, ateş ve grip rahatsızlığın tedavisinde bitkisel bir tıbbi ilaç olarak kullanılmıştır (Silahtaroglu vd., 2014). Daha önce yapılan çalışmalarla çörek otu tohum ekstralarının *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* üzerine antimikrobiyal aktivite etkide bulunarak büyümelerini engellediği gösterilmiştir (Hanafy ve Hatem, 1991).

Çörek otunun sağlığa yararları üzerine yapılan kapsamlı çalışmalar sonucunda antifungal, antimikrobiyal, antisistozomyas, antioksidan, antidiyabetik, antikanser, antienflamatuar ve analjezik, immünmodülatör, kardiyovasküler, gastro koruyucu,

hepato koruyucu, nefroprotektif, akciğer koruyucu ve antiastım, antikonvülsan, antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Padhye vd., 2008). Çörek otu aynı zamanda gıda endüstrisinde oksidasyonu önleyici bitkisel bir antioksidan ajan olarak ve çeşitli gıdalarda baharat olarak kullanılmaktadır (Hassanien vd., 2015). Değerli bileşenleri bünyesinde bulunduran çörek otunun, bu değerli bileşenleri insan metabolizmasına katmak amacıyla kullanım alanları genişletilmelidir. Kullanım alanlarının kısıtlı olmasından dolayı artırmaya yönelik yapılacak araştırmalara ve çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bahsi geçen biyoaktif özelliklerin çoğu durumda timokinon ve uçucu yağlar gibi tohum bileşenlerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Hadi, Mohammed ve Hameed, 2016). *N.sativa* bitkisi üzerine yapılan çalışmalar çoğunlukla tohum ekstraktları ve yağlarıyla ilgili olduğundan çalışmalar iki ayrı bölümde ele alınabilir (Ayhan, 2012). Tohum ekstraktlarında fenolik bileşenler, steroidler, proteinler ve alkaloidler tespit edilip çalışmalarda bunlar üzerine yoğunlaşmışken; çörek otu yağlarından steroller izole edilerek çalışılmıştır. Timokinon (TQ) bileşiği ise fenolik bileşen içeriğinin büyük bir kısmını oluşturmakta ve biyolojik aktivitelerde önemli bir yeri bulunmaktadır (Al-Yahya, 1986).

N. sativa'nın tohum ve bileşenlerinin terapötik etkilerinin ve etki mekanizmalarının incelenmesi için yapılacak çalışmalar önem arz etmektedir (Ahmad vd., 2013). TQ ve alfa-hederin bileşikler ile birlikte bilinenler beraber araştırmalar sonucu belirlenecek diğer biyoaktif bileşenleri de çeşitli hastalıkların tedavisinde ve kemoterapötik ajanlarla uygun kombinasyonlarda birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilir potansiyeli vardır (Ahmad vd., 2013).

Çörek otunun fonksiyonel özelliklerini ilgilendiren çalışmaların çoğu genellikle çörek otunun yağı üzerine olduğundan dolayı çörek otu tohumlarının protein bileşenlerine ait biyoaktif özellikleri çok daha az araştırılmıştır (Çakır ve Gülseren, 2019). Dolayısıyla *N.sativa* bitkisinin proteinleri ile ilgili yapılacak çalışmalar sayesinde daha fazla bilgi edinilmesi ile bu bitki kaynağının bitkisel, fonksiyonel ya da terapötik etkilerinden düzenli bir diyet ile bilinçli bir şekilde faydalanılması sağlanabilir. Tohumun tüketimi nispeten zor olduğundan protein bileşenlerinin üretimi ile bitkinin yenilebilirlik özellikleri geliştirilebilir (Çakır ve Gülseren, 2019).

Çörek otu tohumunun protein miktarı göz önüne alınarak yağı alınmış tohum posalarında protein içeriğinin % 30'dan daha fazla olması beklenebilir (Coşkun vd., 2019). Bitkisel kaynaklı protein bazında yağlı tohumlar tahıllara göre oldukça yüksek miktarda protein içermektedir (Potter ve Hotchkiss, 1995). Proteinlerin hem teknik hem

de biyolojik anlamda işlevsel biyomoleküller oldukları ve çörek otu tohumunu tüketmenin zorluğu düşünüldüğünde bu değerli kaynaktan protein ürünleri üreterek küresel üretimin ve tüketimin artırabileceği öngörülmektedir (Coşkun vd., 2019). Bu çalışmada üretilebilecek olan fonksiyonel bileşenlerle bu potansiyelin destekleneceği düşünülmektedir.

2.10 Çörek otu proteinleri

Tıbbi bitkiler arasında oldukça sık kullanılan bitkilerden olan çörek otu bitkisinin aktif bileşenlerinin kaynağı, bitkinin tohumu ve tohumdan elde edilen yağlarıdır (Goreja, 2003). Hasat mevsimi, ürün çeşidi ve ürünün yetiştirildiği iklime göre değişmekle beraber çörek otu tohumlarında % 20.2 ham protein ve proteinlerin yapı taşı olan bazı aminoasitlerin bulunduğu belirtilmektedir (Vatansever vd., 2013). Yağı alınmış çörek otu tohumundan üretilen protein konsantrasyonunun esansiyel amino asit içeriği ağırlıkça yaklaşık olarak % 33 oranında; protein miktarı ise % 54 olarak bulgulanmıştır (Çakır ve Gülseren, 2019).

Proteinler hakkında fonksiyonel bilgilerin yapısal ve dizilimsel açıklamaların bulunduğu Uniprot Knowledgebase'de (UniProtKB) 5 adet değerlendirilmiş 22 adet ise değerlendirilmemiş çörek otu proteini olduğu belirtilmektedir (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=black+cumin&sort=score>, t.y.). Bunlardan defensin D1, defensin D2, thionin NsW1, thionin NsW2 ve non-specific lipid-transfer protein 1 değerlendirilmiş proteinlerdendir. Bu proteinlerin moleküler fonksiyonları genel olarak genel olarak antibiyotik, antimikrobiyal ve fungusit etkiler olarak raporlanmıştır.

Çörek otunun amino asit içeriğini belirlemek için yapılan bir çalışmada glutamik asit, aspartik asit, lösin, glisin ve arjinin amino asitlerinin en yüksek oranda bulunduğu belirtilmekte ve amino asit içeriği oranları % 22.4 glutamik asit, % 10.05 aspartik asit, % 9.18 arjinin, % 6.92 lösin, % 6.86 glisin, % 6.07 pirolin, % 5.10 valin, % 4.21 alanin, % 4 fenilalanin, % 3.98 isolösin, % 3.95 treonin, %3.91 lizin, % 3.8 serin, % 3.35 tirozin, % 2.83 histidin, % 1.45 metionin, % 1.17 sistin ve % 0.77 triptofan olarak verilmektedir (Al-Gaby, 1998).

Çörek otu tohumunun yağı üzerine daha çok araştırılma yapılmasından dolayı biyoaktif özelliklerinin çoğu, yağında bulunan timokinon ve uçucu yağ bileşenlerine atfedilmiştir (Hadi, Mohammed ve Hameed, 2016). Protein bileşenlerinin biyoaktif özellikleri ise çok daha az araştırılmıştır (Çakır ve Gülseren, 2019). Çörek otu proteinlerinin biyoaktif özelliklerinin araştırılması ve çörek otunun yağı alınmış posasından elde edilecek katma

değerli protein ürünleri üretilmesi hem sürdürülebilir çevre politikasına hem de ülke ekonomisine katkı sağlanması açısından oldukça önemlidir. Uzun yıllardır geleneksel halk tıbbında bitkisel bir kaynak olarak kullanılan çörek otu proteinlerinin biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

2.11 Projede fındık proteinlerinin hidrolizi amacıyla kullanılan enzimler

Bu çalışmada enzimatik hidroliz amacıyla tripsin, kimotripsin ve termolisin proteazları kullanılmıştır. Bu proteazlar hakkında aşağıda kısaca bilgiler verilmiştir.

Termolisin (EC 3.4.24.27), Gram (+) *Bacillus thermoproteolyticus* organizmasından izole edilen 34,6 kDa moleküler ağırlığa sahip, termostabil kalsiyum bağlayıcı bir çinko endopeptidazdır. Öncelikli olarak hidrofobik amino asit kalıntılarının N-terminal tarafındaki protein bağlarını hidrolize eder (Rawlings ve Barrett, 1995).

Tripsin (EC 3.4.21.4), serin proteazların endopeptidaz bir üyesidir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 23.8 kDa ve 223 amino asit kalıntısından oluşan tek zincirli bir polipeptitten oluşur. Tripsin, lizin ve arginin amino asit kalıntılarının C-terminal tarafındaki peptitleri parçalar (Walsh, 1970; Keil, 1971). Ayrılma bölgesinin her iki tarafında asidik bir kalıntı varsa, hidroliz oranı daha yavaştır ve ayrılma bölgesinin karboksil tarafında bir prolin kalıntısı varsa ayrılma olmaz (Yaron vd., 1993; Keil, 1971).

Endopeptidaz sınıfından olan serin proteazlar, aktif merkezlerinde esansiyel serin dizisi varlığına sahiptirler. Serin proteazlar proteinlerin lizin ve arginin artıklarının karbonil uçlarının spesifik hidrolizini gerçekleştirmektedir. Metabolizmada hormon ve immün sistem aktivitesi, kan pıhtılaşması gibi birçok proseste bulunurlar (Ahsan ve Watabe, 2001). Serin proteazlar sınıfından olan tripsin enzimi de hidrolitik bir enzimdir (Bisswanger, Nouaimi ve Klaus, 2001). Moleküler ağırlığı ise 23,8 kDa olarak belirtilmektedir (Ahsan ve Watabe, 2001). (Tripsin Arg-X, Lys-X bölgelerinden keserek proteinlerin yıkımını gerçekleştirmektedir (Bisswanger, Nouaimi ve Klaus, 2001). Tripsinojen adlı aktif öncü protein olarak pankreastan salgılanan tripsin enzimi, bağırsak mukozasından salgılanan enterokinaz enzimi ile aktif forma geçirilir. Oto-katalitik olarak tripsinojenin aktivasyonundan ve kimotripsin, elastaz, karboksi-peptidaz gibi proteazların aktivitesinden de sorumludur (Malmsten ve Larsson, 2000). Tripsin enzimi katalizinin mekanizması; substrata bağlanma, His-57 tarafından desteklenen Ser-195'ten protein transferiyle peptit üzerinde bulunan bağın karbonil grubuna nükleofilik saldırısıyla peptit bağlarının yıkımı ve ilk ürünün serbest kalması, His-57 ile desteklenen açıl-enzim arasına suyun girmesi ve tetrahedral aranının oluşumuyla açıl aranının çözülmesi ve ikincil ürünün serbest kalması şeklinde gerçekleşmektedir (Perona ve Craik, 1994).

Kimotripsin (EC 3.4.21.1) de serin proteazların endopeptidaz bir üyesidir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 25 kDa olup 241 amino asit kalıntısı içermektedir (Matthews vd. 1967; Burrell, 1993). Peptit bağlarını fenilalanin, tirozin, triptofan ve lösin kalıntılarında sonraki karboksil gruplarından parçalar. Ayrıca metiyonin, izolösin, serin, treonin, valin, histidin, glisin ve alaninin amino asit kalıntılarının olduğu C-terminal tarafında da parçalanmalar meydana geldiği bildirilmiştir (Burrell, 1993)

Papain enzimi ise çok fazla sayıda ve düşük moleküler ağırlıkta peptit elde edilmesini sağlayarak, biyoaktif özellik gösterme potansiyeli olabilecek peptitlerin araştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Literatürde de yaygınlıkla değerlendirildiği bilinmektedir. Endo proteazlar sınıfında yer alan sistein proteazlar; aktif merkezlerinde bulunan sistein (Cys), histidin (His) ve aspartik asitten (Asp) oluşan üçlü katalitik yapıları ile karakterizedirler (Bugg, 1996). Papain (EC 3.4.22.2) papaya (*Carica papaya* L.) lateksinden izole edilmiş endolitik bir bitkisel sistein proteazıdır (Amri ve Mamboya, 2012). Papain, olgunlaşmamış papaya derisinin kesilmesi ve daha sonra kesilmiş olan lateksin toplanması ve kurutulmasıyla elde edilir. Meyvenin yeşilliğinin artmasıyla papainin aktifliği arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Meyve ne kadar yeşil olursa papain enziminin de o kadar aktif olmaktadır (Amri ve Mamboya, 2012).

Papain; 1CVZ PDB erişim numarasına, 23.406 Da moleküler ağırlığa, dört disülfür köprüsüne sahip olan, tek zincirli protein yapısında bulunan ve Gln19, Cys25, His158 ve His159'da katalitik etkileri olan bir enzimdir (Robert vd., 1974). Ayrıca çok çeşitli koşullar altında stabil ve aktif kalabilen, yüksek sıcaklıklarda dahi kararlı olabilen bir enzimdir (Cohen vd., 1986). Farklı substratlara göre aktivitesi değişen papain için optimum pH 3.0-9.0 aralığında belirtilmektedir (Edwin ve Jagannadham, 2000). Papain, sülfidril grubu enzim aktivitesi için oldukça gereklidir, üç disülfid köprüsüne sahip olan tek zincirli bir polipeptittir (Rostika vd., 2018). Papain 212 aminoasidin tek bir polipeptidinden oluşmaktadır ve aktif bölgesine 7 amino asit yerleşebilmektedir (Fersht, 1998). Papainin proteolitik aktivitesinin, elastin ve proteoglikanları parçalanması gibi aktiviteler de dahil olmak üzere pepsin ve pankreatinden daha güçlü olduğu belirtilmektedir (Paul vd., 2013). Papain; proteinlere, kısa zincirli peptitlere, amino asit esterlerine ve amid zincirlerine karşı gösterdiği geniş proteolitik etki nedeniyle gıda ve ilaç endüstrilerinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Amri ve Mamboya, 2012). Papain enzimi özellikle bazik amino asitleri (arginin, lisin ve fenilalanin) içeren peptit bağlarını parçalamaktadır (Menard vd., 1990).

Papain enziminin mekanizması, aktif bölgede bulunan üç amino asidin sistein-25 kısmı ile termal amino kısmını serbest bırakan peptit zincirinin omurgasındaki karbonil grubu karbonunu etkileme şeklindedir (Amri ve Mamboya, 2012). Peptit bağlarını koparan bu mekanizma, Cys-25'in His-159 ile etkisiz hale getirilmesidir. Proteinin peptit zincirleri boyunca bu işlem gerçekleştiğinden protein parçalanmaktadır. Asparagin-175 ise bu işlemin gerçekleşmesi için His-159'un imidazol halkasına yönlendirmektedir. Asparagin-175 amino asidi ile beraber bu üç amino asit papain enziminin aktif bölgesinde çalışan ve enzimin kendine özgü fonksiyonlarını sağlamayan amino asitlerdir (Menard vd., 1990).

Papain enzimi, proteinlerin katlanma ve açılma davranışlarını anlayabilmek için iyi bir sistem sağlayan ve iyi tanımlanmış iki alandan oluşmaktadır (Edwin vd., 2002). Papain, molekülün katlandığı üç disülfür köprüsü boyunca dengelenmekte ve enzim stabilitesine katkıda bulunan yan zincirler arasında güçlü bir etkileşim oluşturmaktadır (Edwin ve Jagannadham, 2000). Katalitik yapısı ise amino asitler sistein-25 ve histidin-159'dan oluşmaktadır (Menard vd., 1990).

Ayrıca proteinlerin hidrolizinde papain, tripsin, pepsin, alkalaz enzimlerinin kullanımı giderek artmaktadır (Aspmo vd., 2005). Gıdalardan spesifik biyoaktif peptitlerin üretilmesinde belirli proteolitik enzimlerin kullanıldığı bilinmemekle beraber bazı enzimlerin daha düşük moleküler ağırlıklı biyoaktif peptitler üretme eğiliminde olduğu bilinmektedir (Daliri, Oh ve Lee, 2017). Örneğin; *Achatina fulica* salyangoz ayak kası proteininin papain ve tripsin tarafından hidroliz edildiği örneklerde daha fazla sayıda küçük moleküler ağırlıklı peptit elde edildiği belirtilmektedir (Huang vd., 2017). Bilinen biyoaktif peptitlerin çoğu da gastrointestinal enzimlerden olan pepsin ve tripsin kullanılarak üretilmiştir (Gobbetti, Minervini ve Rizzello, 2004). Örneğin; anjiyotensin-dönüştürücü enzimi (ACE) inhibe eden biyoaktif peptitler çoğunlukla tripsin kullanılarak üretilmiştir (Meisel ve FitzGerald, 2003).

Düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin (<10 kDa), yüksek moleküler ağırlıklı peptitlere göre daha etkili antioksidan ve antihipertansif peptitler olduğu bilgisinden yola çıkarak; ticari olarak biyoaktif peptitlerin üretilmesinde düşük moleküler ağırlıklı peptitler üreten proteazların seçilmesi faydalı olacaktır (Wattanasiritham vd., 2016).

Literatürde fındık proteinlerinin ve peptitlerinin biyoaktif özellikleri üzerine çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Buna ek olarak, literatürde düzenli olarak fındık ve bileşenlerinin alerjik özelliklerine vurgu yapıldığı bilinmektedir. Bu iddiaların bilimsel temeli olmakla birlikte doğru teknolojik uygulamalarla hem insan sağlığına olumlu etkileri



bulunan hem de alerjik özellikleri baskılanmış fındık bileşenleri üretilebileceği düşüncesini taşımaktayız. Aynı zamanda enzimatik parçalanmanın alerji giderici potansiyeli de bulunabilmektedir (Yu vd., 2011). Bu çalışmada ülkemiz ekonomisinde oldukça önemli bir yeri olan Giresun tombul fındığına ait soğuk pres posalarında farklı enzim ve modern fraksiyonlama teknikleri kullanılarak antihipertansif, antidiyabetik ve antioksidatif etkileri bulunan biyoaktif peptitlerin üretilmesi hedeflenmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Materyaller

Antihipertansif, antidiyabetik ve antioksidatif peptitler elde etme amacıyla yapılan bu çalışmada endüstriyel yağlı fındıkların soğuk pres posaları ham madde olarak kullanılmıştır. Giresun tombul fındığı (*Corylus avellana* L.) posası Oneva (Neva Gıda Ltd., İstanbul, Türkiye) tarafından temin edilmiştir. Benzer şekilde, çörek otu posası da aynı firmadan temin edilmiştir. Piyasadaki başka tedarikçilerin de (Fiskobirlik tedarikçileri dâhil olmak üzere) numuneleri değerlendirilmiş olmakla birlikte tekrar edilebilirlik ve performans açısından söz konusu firmanın numuneleri tercih edilmiştir. Piyasadaki bazı posalarda “çerezlik vasfını kaybetmiş” ham maddelerin kullanılmış olması; tekrar edilebilirlik açısından ciddi bir problemdir.

Çalışmada kullanılan enzim ve kimyasallar; Kaptopril (PHR1307-1g), ACE (A6778-1 un), N-Hippuryl-His-Leu (H1635-1g), termolisın (P1512-100mg), tripsin (T4799-100g), kimotripsin (C4129-1g), DPP-IV (D4943-1vl), Diprotin-A (I9759-25mg), Gly-Pro-pNA (G0513-100mg), Tris (GE17-1321-01), sodyum kazeinat (C8654-1kg), 2,4,6-trinitrobenzensülfonik asit solüsyonu (TNBS) (P2297-10ml), borik asit (B6768-1kg), trifloroasetik asit (T6508-25ml) ve diğer kimyasallar Sigma Chemical Corp. (St Louis, MO, ABD) dan temin edilmiştir.

3.2 Metot

3.2.1 Bitkisel posanın kompozisyon analizi

Protein tayini NMKL (2003) metoduna göre yapılmıştır. Ham madde ve izolatların analizinde en az 3 numune kullanılmış ve hesaplamalarda dönüşüm faktörü 6,25 alınmıştır. Nem yüzdesi AOAC 950.46B protokolüne göre belirlenmiştir (AOAC, 2006). Bir kapta 2 g numune tartılarak etüvde 100–102°C’de 16–18 saat süreyle tutulmuştur. Bu sürenin sonunda numune bir desikatörde soğutulmuş ve ağırlık farkı, numunenin nem yüzdesini hesaplamak için kullanılmıştır.

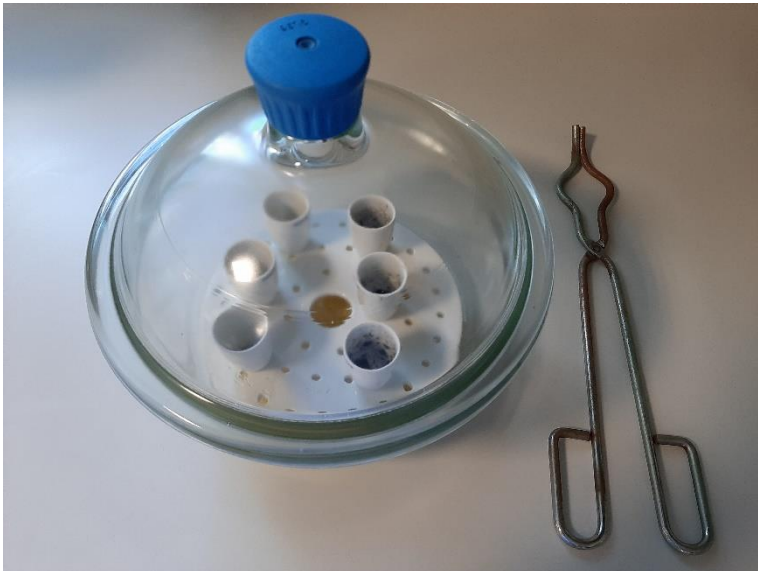


Şekil 1. Numunelerin nem tayinine tabi tutulması.

Numunelerdeki kül miktarı, organik maddenin yanmasından veya tamamen oksidasyonundan sonra inorganik kalıntıların analizine dayalı olarak AOAC 938.08 (AOAC, 1938) protokolüne göre belirlenmiştir. Sabit tartıma getirilen porselen krozelere 2 g numune tartılmıştır ve numuneler, sabit tartıma gelene kadar 550°C’de tutulmuştur. Süre sonunda krozeler soğumaları için desikatöre alınmıştır. Kül yüzdesi, inorganik tortunun toplam ağırlıkla tartılmasıyla hesaplanmıştır.



Şekil 2. Numunelerin kül tayinine tabi tutulması.



Şekil 3. Desikatöre soğuması için alınan örnekler.

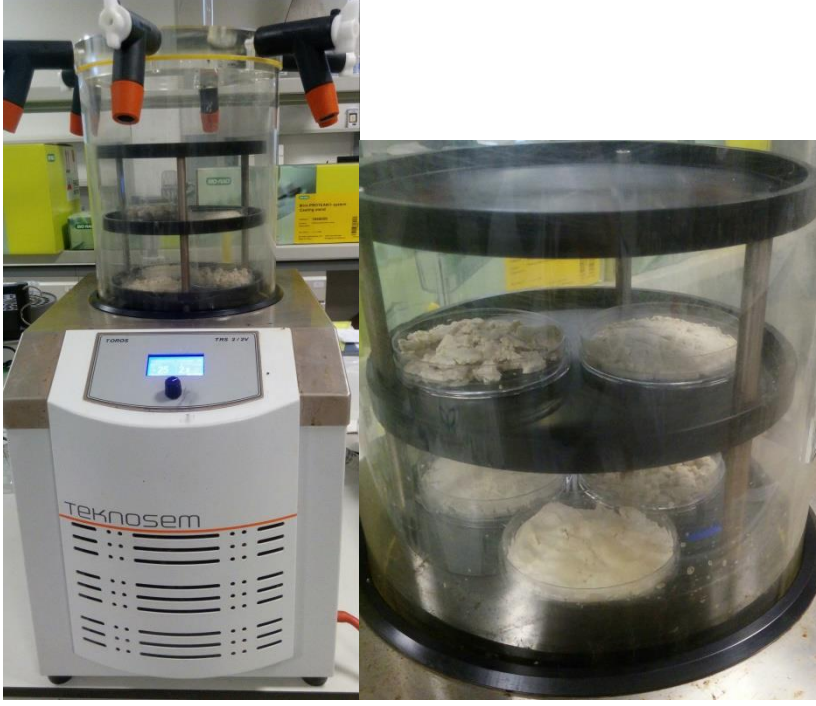
Numunelerle ilgili temel ölçümlerin sonuçları bu kısımda (Tablo 4) özetlenmektedir. Bulgular uygun tekniklerle yüksek protein içeriği olan protein izolatları üretmenin mümkün olduğunu göstermektedir.

Tablo 4. Fındık küspesi ve fındık protein izolatları için kuru bazda nem, kül, protein içeriği (% g/g). Değerler, en az 2 bağımsız ölçümün ortalamasını vermektedir.

	Fındık küspesi	Fındık proteini izolatu
Nem (%)	8,94±0,2	3,44±0,2
Kül (%)	6,42±0,1	1,18±0,1
Protein (%)	50,02±1,4	94,81±1,8

3.2.2 Bitkisel posalardan protein izolatlarının üretilmesi

Protein konsantrlerinin üretimi için Boye vd. (2010) tarafından bildirilen alkali ekstraksiyonu-izoelektrik çöktürme (AE-İÇ) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde yağ alınmış fındık küspeleri su ile karıştırılarak (1:15, ağırlık/hacim) dispers hale getirilmiştir. Ortamın pH değeri 1 N NaOH çözeltisi kullanılarak pH 9,5'a sabitlenmiş ve dispersiyon, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile 500 rpm'de 1 saat karıştırılmıştır. Ardından dispersiyonlar, yüksek hızlı santrifüj CR22 N (Hitachi Koki Co., Ltd., Tokyo, Japonya) kullanılarak 10000xg'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir (20°C). Çözünmüş proteinleri içeren sıvı faz toplanarak ortamın pH değeri 1 N HCl ile pH 4,5 değerine indirilmiştir. Böylelikle proteinlerin izoelektrik çökmesi teşvik edilmiştir. Çökelen proteinleri ayırmak için aynı koşullarda tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Çökelen protein konsantrileri toplanarak liyofilizasyon işlemine kadar -20°C'de saklanmıştır. Üretilen protein izolatları çalışmalarda kullanılmak üzere toz formda tekrar -20°C'de saklanmıştır. Liyofilizasyon işlemleri (her bir batch için), cihaz spesifikasyonlarına uygun olarak -54°C ve 10⁻³ mbar koşullarında 18 saat boyunca yürütülmüştür (TRS 2-2V, Teknosem, İstanbul).



Şekil 4. Protein izolatlarının liyofilizasyonu.



Şekil 5. Liyofilize protein örneklerinin toz hale getirilerek -20°C'de saklanması.

3.2.3 Protein izolatlarının proteolitik hidrolizi

Fındık proteini hidrolizatlarının üretimi için ilk aşamada tripsin, kimotripsin ve termolislin proteazları kullanılmıştır. Dispersiyon %1 fındık protein konsantreleri kullanılarak 100 mM Tris-HCl pH:8 tamponunda hazırlanmıştır. Protein dispersiyonlarına, tripsin ve kimotripsin için 1:100, termolislin için 1:50 (enzim: substrat) oranda proteazlar eklenmiştir. Enzimatik proses uygun bir karıştırıcı termomikser kullanılarak 37°C 1000 rpm'de üzerinden 1 gece geçecek biçimde (18 saat) sürdürülmüştür. Bu süreci takiben enzim inhibisyonu için çözeltiler 95°C'ye ısıtılıp bu sıcaklıkta 5 dakika tutulmuştur.

Sonrasında numuneler buz banyosuna alınarak hızlıca soğutulmuştur. Termolisin enziminin inhibisyonu için ayrıca final konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde formik asit çözeltisi (%10) eklenmiştir. Çözünmeyen parçacıklar santrifüj yoluyla (30 dakika, 5000xg) ayrılmıştır. Son olarak, numuneler 0.45 µm PVDF şırınga filtreden geçirilmiştir (Gülseren & Corredig, 2013).

Papain ile hazırlanan fındık proteini hidrolizatı için, enzim:protein oranı 1:100 olacak şekilde pH 7.0'da 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde karışım hazırlanmıştır. Eppendorf tüplerindeki karışım için enzimatik proses karıştırıcılı termomixer kullanılarak 50 °C'de 1000 rpm'de 150 dakika sürdürülmüştür.

Bromelain ile hazırlanan fındık proteini hidrolizatı için, enzim:protein oranı 1:100 olacak şekilde pH 4.5'te 30 mM sodyum asetat tampon çözeltisi içerisinde karışım hazırlanmıştır. Eppendorf tüplerindeki karışım için enzimatik proses karıştırıcılı termomixer kullanılarak 45 °C'de 1000 rpm'de 150 dakika sürdürülmüştür.

Pepsin ile hazırlanan fındık proteini hidrolizatı için, enzim:protein oranı 1:100 olacak şekilde, saf suyun 1 N HCl ile pH 2.0'ye getirilmesiyle elde edilen tampon çözeltisi içerisinde karışım hazırlanmıştır. Eppendorf tüplerindeki karışım için enzimatik proses karıştırıcılı termomixer kullanılarak 37 °C'de 1000 rpm'de 18 saat sürdürülmüştür.

Demir şelasyon aktivitesi testi için tampon çözelti kullanılmadan proteinler saf su içinde hazırlanmış ve 1 M NaOH kullanılarak suyun pH değeri, pH 8'e ayarlanmıştır. Sonraki işlemler yukarıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 TNBS yöntemi ile hidroliz derecesinin belirlenmesi

Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) yöntemi, gıda proteini hidrolizatlarının hidroliz derecesini belirlemek için doğru, tekrarlanabilir ve genel olarak uygulanabilir olması sebebiyle yaygın olarak tercih edilmektedir. TNBS ile pirimer amino gruplarının arasındaki reaksiyon sonucu ortaya çıkan kromofor'un spektrofotometrik ölçümüne dayalı bir yöntemdir. Reaksiyon sonucu oluşan kromofor açık sarı bir renk oluşturur ve bu rengin absorpsiyon veya optik yoğunluğu çözeltide bulunan serbest amino asit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Adler-Nissen,1979).

TNBS yöntemi Adler-Nissen (1979) tarafından tarif edilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bir gece geçecek biçimde (18 saat) inkübe edilen %1 oranında protein içeren hidrolizat örnekleri, enzim inaktive edildikten ve santrifüjlendikten sonra,

%1'lik SDS ile seyreltilmiştir. Daha sonra 0.25 mL'lik örnekler aliminyum folyo ile sarılmış deney tüplerine alınarak üzerlerine 2 mL 0.2125 M sodyum fosfat tampon (pH 8.2) ve 2 mL %0,1'lik TNBS ilave edilerek su banyosunda 50°C sıcaklıkta 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için deney tüplerine 4 mL 0.1 N HCl ilave edilmiştir. Örneklerin absorbans değerleri Shimadzu UV-1280 model UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu, Milton Keynes, İngiltere) cihazı kullanılarak 340 nm'de kontrol çözeltisine karşı okunmuştur. Kontrol çözeltisi için 0.25 mL %1'lik SDS ve standart çözeltisi için 1.5 mM L-lösin kullanılmıştır. Ayrıca referans örnek olarak sodyum kazeinat (C8654, Sigma-Aldrich Corp.) kullanılmıştır. Sodyum kazeinat, protein numuneleri ile benzer koşullarda triptik hidrolize tabi tutulmuştur. Örneklerin lösin amino eşdeğeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{lösin NH}_2 (\text{meqv/g}) = \frac{\text{Abs}_{\text{örnek}} - \text{Abs}_{\text{kontrol}}}{\text{Abs}_{\text{standart}} - \text{Abs}_{\text{kontrol}}} \times S \times C_{\text{standart}} \times \frac{1}{X \times P}$$

Abs: Absorbans değerleri (340 nm)

C_{standart}: Standart olarak kullanılan lösin konsantrasyonu (meqv/L)

S: Seyreltme faktörü

X: Örnek miktarı (g)

P: Örnekteki % protein miktarı (yaş bazda)

Örneklerin hidroliz derecelerinin hesaplanmasında aşağıdaki eşitlikler kullanılmıştır.

$$\%DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

$$h = (\text{lösin NH}_2 - b) / a \text{ meqv/g protein}$$

DH: Hidroliz derecesi

h: Parçalanmış peptit bağları (meqv/g protein)

h_{tot}: Toplam peptit bağları (meqv/g protein)

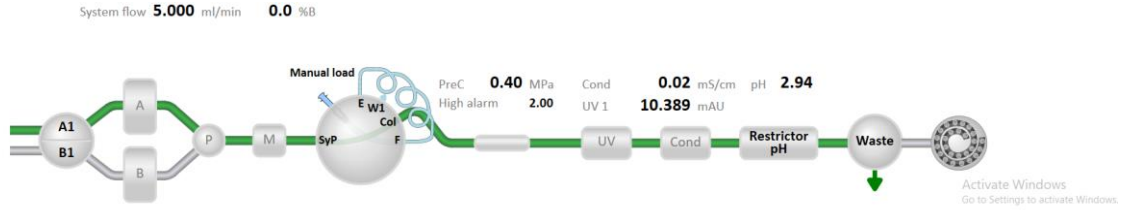
Örnekler için a, b ve h_{tot} sabitlerinin değeri Nielsen vd. (2001) tarafından bildirilen ortalama değerler kullanılmıştır. Çoğu protein için, amino asitlerin ortalama moleküler ağırlığı, yaklaşık 125 g/mol'dür ve kg protein başına h_{tot} eşdeğeri yaklaşık 8 gramdır. Hammadde incelenmediğinde, a ve b'nin sırasıyla 1.00 ve 0.40 olduğu tahmin edilir (Nielsen vd. 2001).

3.2.5 Peptitlerin fraksiyonlara ayrılması

Hidroliz edilen fındık proteinleri AKTA- Pure 25-L1 FPLC kromatografi sistemi (GE Healthcare, Buckinghamshire, İngiltere) kullanılarak fraksiyonlanmıştır. Fraksiyonlama

işlemi için HiTrap Capto Q (GE Healthcare, Buckinghamshire, İngiltere) anyon değişimi kolonu ile yürütülmüştür. Bu hazır kolonda boyut farklılığının fraksiyonlamaya etkisinin olup olmadığını incelemek amacıyla 1 ml ve 5 ml yatak hacimli iki farklı boyut denenmiştir. Kolon hacminde akış hızı (1 CV/dk) verilerek yine kolon hacmi kadar hidrolizat örnekleri kolona enjekte edilmiştir. Kolona bağlanmayan bileşiklerin uzaklaştırılması için 5 kolon hacminde (CV) tuz içermeyen 20 mM Tris-HCl (pH:8.3) tamponu ile kolon yıkanmıştır. Yıkama sırasında kolondan uzaklaştırılan bileşikler aktivite testlerinde kullanılmak üzere toplanmıştır. Kolona bağlı bileşiklerin elüsyon işlemi için ise tuzlu 20 mM Tris-HCl (0,6 M NaCl, pH 8.3) tamponu kullanılmıştır. Elüsyon işlemi 32 CV boyunca 0,6 M NaCl konsantrasyonuna kadar tuz konsantrasyonu lineer bir şekilde artırılarak gerçekleştirilmiştir. Elüsyon işlemi boyunca 2 CV aralıklarla fraksiyonlama yapılarak kolondan koparılan bileşikler deney tüplerine toplanmıştır. Tüm aşamalarda 280 nm dalga boyunda UV dedektör ve iletkenlik değerleri takip edilmiştir. Toplanan tüm fraksiyonlar aktivite testlerinde kullanılmak üzere -20°C de kısa süreli depolanmıştır. DPP-IV önleyici aktivite testi için ayrı olarak 100 mM Tris-HCl pH:8 tamponunda aynı şekilde fraksiyonlama işlemi yapılmıştır.

Hidrolizatları peptitlerin farklı özelliklerine göre grupelemek için FPLC sistemi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan FPLC sisteminin akış yolu Şekil 6 üzerinde gösterilmektedir.



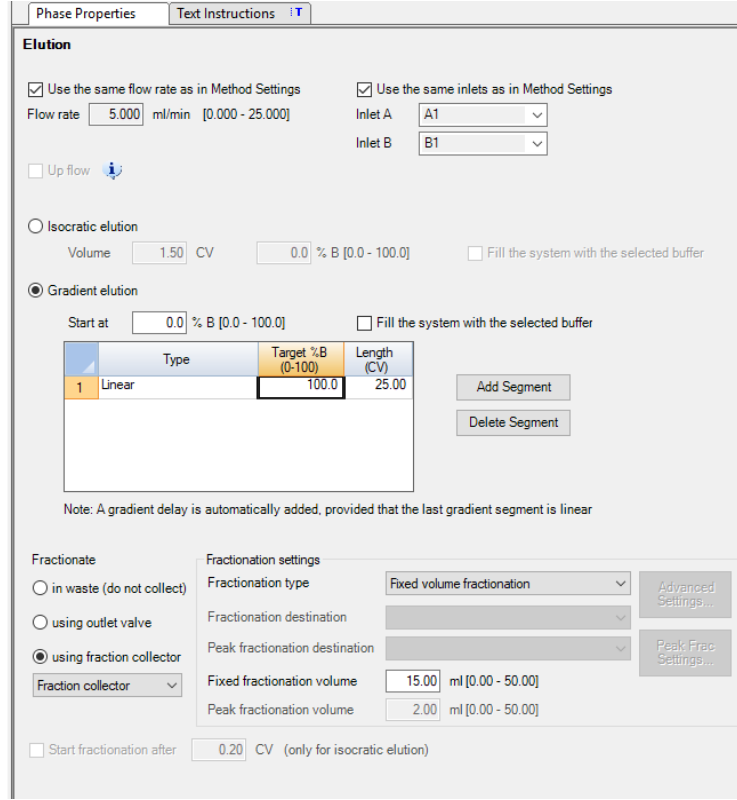
Şekil 6. FPLC akış yolu

Önceki çalışmalarda FPLC'ye ait farklı özellikteki 1 ml hacimli kolonlarla denemeler yapılmıştır. Hidrofobik kolonlarda etkileşim görülmediği için genelde iyon değiştirici kolonlar ile çalışılmıştır. Kolonlardan Capto DEAE (zayıf anyonik), Capto Q (güçlü anyonik), Capto S (güçlü katyonik), DEAE FF (zayıf anyonik) kullanılmıştır. Bu denemelerde uygun metot kurularak kullanılan tampon çözeltinin pH'sı, kullanılan tampon çözeltinin tuz konsantrasyonu, CV ("column volume") gibi parametreler değiştirilerek diğerlerine göre en yüksek absorbans değerinde fraksiyonlarda 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 deneme yapılmıştır.

FPLC sisteminde fındık proteini hidrolizatları için kurulan metotlara ve cihazın faal olduğu bir fraksiyonlama işlemi sırasıyla Şekil 7A ve 7B'de gösterilmiştir. Fraksiyonlama sayesinde toplanan fraksiyonların biyoaktif özellikleri incelenmiştir.



A



Phase Properties Text Instructions

Elution

Use the same flow rate as in Method Settings Flow rate: 5.000 ml/min [0.000 - 25.000]

Use the same inlets as in Method Settings Inlet A: A1 Inlet B: B1

Up flow

Isocratic elution

Volume: 1.50 CV 0.0 % B [0.0 - 100.0] Fill the system with the selected buffer

Gradient elution

Start at: 0.0 % B [0.0 - 100.0] Fill the system with the selected buffer

Type	Target %B (0-100)	Length (CV)
1 Linear	100.0	25.00

Add Segment Delete Segment

Note: A gradient delay is automatically added, provided that the last gradient segment is linear

Fractionate: in waste (do not collect) using outlet valve using fraction collector

Fractionation settings: Fractionation type: Fixed volume fractionation Fractionation destination: Peak fractionation destination: 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)



Şekil 7. (A) FPLC'de fraksiyonları için kurulan örnek metot, (B) FPLC'de hidrolizatların düzenlenen metot ile fraksiyonlanması.

3.2.6 ACE-önleyici aktivite testleri

Peptitlerin *in vitro* ACE-önleyici aktiviteleri, hippurik asit oluşumu ile belirlenebilir. Bu yöntemde, Hippuril-His-Leu (HHL) bileşiği substrat olarak kullanılmakta ve ACE aktivitesi ile bu kompleks, hippurik asit (HA) ile His-Leu dipeptidine ayrıştırılmaktadır (Sinha vd.2007).

Bu çalışmada, ODS-3 C18 kolonu kullanılarak Sheih vd. (2009) tarafından tarif edilen yöntem uygun değişikliklerle kullanılmıştır. ACE aktivitesi testi HPLC sistemi (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japonya) kullanılarak gerçekleştirildi. HPLC sistemi; sıvı kromatografi LC-20AD solvent dağıtıcı modülü, SIL-20A HT oto örnekleyici, DGU-20A5R degazer, SPD-20A UV-VİS dedektör ve CTO-10AS VP kolon fırınından oluşturulmuştur. ACE aktivite gösterebilmesi için final konsantrasyonunda yaklaşık 300 mM NaCl içermesi gerekli görülmüştür. Bu nedenle önceden 20 mM Tris-HCl tamponunda saflaştırılan peptit fraksiyonlarının tuz konsantrasyonları yaklaşık olarak 0.6 M NaCl içerecek şekilde ayarlanmıştır. Sodyum borat (0.1 M pH:8.3) tamponunda hazırlanan 1.68 mU 250 µl ACE ile 250 µl peptit fraksiyonu karıştırılarak 5 dakika 37°C 500 rpm'de termomikser içerisinde ön inkübasyon yapılmıştır. Bu işlemi takiben 3.94 mM HHL (15 µl) karışıma eklenerek tepkime 1 saat sürdürülmüştür. Süre bitiminde, 1 M HCl (500 µl) karışıma eklenerek tepkime durdurulmuştur. Bu karışımdan 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, 0.6 ml/dakika olarak kullanılmıştır. Kontrol olarak 20 mM Tris-HCl + 0,6M NaCl tamponu kullanılmıştır. Referans inhibitör olarak kaptopril inhibitöründen yararlanılmıştır. Kaptopril, Tris-HCl+0,6M NaCl tamponunda çözülerek final konsantrasyonunda 0,05 µM içerecek şekilde hazırlanmıştır. 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 değerleri belirlenmiştir.

3.2.7 DPP-IV önleyici aktivite testleri

Peptit fraksiyonlarının DPP-IV önleyici aktivitelerini belirlemek için Nongonierma vd. (2018) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Fraksiyon örneklerinden ve substrattan (0.2 mM Gly-Pro-pNA) 25 µl Eppendorf tüpü içerisine alınarak karıştırılmıştır. Bu karışım 37°C'de termomikser içerisinde 10 dakika süreyle ön inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda DPP-IV (0,01 ünite/ml) enziminden 50 µl karışıma eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Tepkime 1 saat sürdürülmüş ve süre sonunda substrattan salınan pNA miktarı Shimadzu® BioSpec NanoDrop spektrofotometresi (Shimadzu, ABD) kullanılarak 405 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Referans inhibitör olarak Diprotin A'dan (8 µM) yararlanılmıştır. Bütün reaktifler 100 mM Tris-HCl pH:8 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.

$$\%DPP-IV \text{ inhibisyon aktivitesi} = \frac{Abs_{kontrol} - Abs_{örnek}}{Abs_{kontrol}} \times 100 \quad (2.4)$$

3.2.8 Anti-oksidatif aktivite testleri

3.2.8.1 Demir şelasyon aktivitesi testi

Fe²⁺ (demir-II) iyonlarını bağlamak için, demir iyonlarının indikatörü olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışması beklenir. Metal bağlayıcı bileşiklerin şelatlama aktivitesine bağlı olarak magenta renkli Fe²⁺-ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir. Bu yöntem bileşiklerin demir iyonlarını bağlayarak engellemesi ve 562 nm'de maksimum absorbands veren magenta rengin ve absorbands değerinin giderek azalması esasına dayanmaktadır. Düşük absorbands değeri, ilgili bileşiğin yüksek demir iyonu bağlama aktivitesine işaret etmektedir (Acay, 2018).

Bu çalışmada protein hidrolizatlarının Fe²⁺ iyonlarını şelatlama kapasitesi Dinis vd. (1994) yöntemine uygun olarak belirlenmiştir. Tampon çözeltilerin analiz sonuçlarını engellemesi sebebiyle bu test için tampon çözelti kullanılmadan proteinler hidroliz edilmiş ve fraksiyonlama işlemi yapılmadan doğrudan hidrolizat örnekleri kullanılmıştır. Tripsin, kimotripsin ve termolisin enzimleri ile önceki bölümlerde hazırlanışı tarif edilen 0,5 ml hidrolizat örneği, 1,6 ml deiyonize su ve 0,05 ml 2 mM FeCl₂ ile karıştırılmıştır. 30 saniye sonra bu karışıma 0,1 ml 5 mM ferrozin eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyonun ardından numunelerin absorbandsları 563 nm'de UV- 1280 UV-Vis spektrofotometresi (Shimadzu, Japonya) ile ölçülmüştür. Kontrol örneği için 2,1 ml deiyonize su kullanılmıştır. Bu testte, EDTA pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Numunelerin % şelatlama kapasitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Şelatlama Aktivitesi} = \frac{Abs_{kontrol} - Abs_{örnek}}{Abs_{kontrol}} \times 100 \quad (2.5)$$

Bu formülde Abs, indis olarak yazılan numunelerin absorbandsı anlamındadır (birimsiz).

3.2.8.2 Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi

Hidroksil radikali düşük pH değerlerinde tiyobarbitürik asit (TBA) ile ısıtıldıktan sonra pembe bir kromojen veren ürünler oluşturmak üzere deoksiriboza saldırır. Eklenen hidroksil radikal tutucu bileşikler üretilen hidroksil radikalleri için deoksiriboz ile rekabet eder ve kromojen oluşumunu azaltır (Halliwell vd.1987). Ancak pek çok antioksidan aynı zamanda metal şelatlayıcı olduğu için Fe²⁺'nin aktivitesini değiştirebilir. Bu yüzden değerlendirilen antioksidanın iyi bir metal şelatlayıcı mı ya da hidroksil radikali giderici mi olduğunun kesin anlaşılabilmesi metodun dezavantajıdır (Becker vd., 2004).

Bu çalışma Halliwell vd. (1987) tarafından gerçekleştirilen yöntemine uygun olarak yapılmıştır. 0.1 ml 10 mM FeSO₄, 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 H₂O₂ 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 inince absorbans değerleri 532 nm'de UV- 1280 UV-Vis spektrofotometresi (Shimadzu, Japonya) ile ölçülmüştür. Kontrol örneği olarak peptit çözeltisi yerine tampon çözelti kullanılmıştır. BHT (0,03 mg/ml), bu deneyde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Numunelerin % Hidroksil radikali tutma kapasitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ OH Radikali Tutma Aktivitesi} = \frac{\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{örnek}}}{\text{Abs}_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (2.6)$$

Bu formülde Abs, indis olarak yazılan numunelerin absorbansı anlamındadır (birimsiz).

3.2.8.3 Superoksit anyon tutma aktivitesi testi

Pirogallol sulu çözeltide hızla otoksidize olan bir bileşiktir. Çözeltide ilk önce 400-425 nm arasında maksimum absorbans gösteren sarı-kahverengi renk oluşmaktadır. Birkaç dakika sonra renk yeşile dönmeye başlar ve son olarak, birkaç saat sonra sarı bir renk görünür. Absorbans değerindeki artış ile oksijen tüketimi arasında sabit bir ilişki bulunmaktadır. Eğer reaksiyon ortamında süperoksit radikali giderme aktivitesi olan bileşikler varsa, düşük absorbans değerleri elde edilir (Marklund ve Marklund,1974).

Bu çalışmada Marklund ve Marklund (1974) tarafından gerçekleştirilen yöntem uygun değişikliklerle uygulanmıştır. Tris-HCl tampon çözeltisi (20 mM, pH 8.3) içinde fraksiyonlanan 2 ml peptit çözeltileri 40 µL 10 mM HCl'de hazırlanmış 45 mM pirogallol ile karıştırılmıştır. Karıştırma işlemini takiben oda sıcaklığında 5 dakika beklenmiş ve süre sonunda karışımın absorbansı 420 nm'de UV- 1280 UV-Vis spektrofotometresi (Shimadzu, Japonya) ile ölçülmüştür. Kontrol örneğinde peptit çözeltisi yerine Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. BHT (0,03 mg/ml) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Numunelerin % anyon tutma kapasitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Superoksit Tutma Aktivitesi} = \frac{\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{örnek}}}{\text{Abs}_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (2.7)$$

Bu formülde Abs, indis olarak yazılan numunelerin absorbansı anlamındadır (birimsiz).

3.2.9 Asetilkolinesteraz (AChE) Önleyici Aktivitesi Testi

Elde edilen protein ve peptitlerin, anti-Alzheimer etkilerinin incelenmesi için asetilkolinesteraz (AChE) önleyici aktivite testinden yararlanılmıştır (Şenol vd., 2010). Çörek otu proteinlerinin tripsin ve papain enzimleri ile elde edilmiş hidrolizatlarının AChE önleyici aktiviteleri belirlenmiştir. Bu amaçla, oda sıcaklığına getirilmiş 10 µl peptit numuneleri (0, 15, 30, 60, ve 120. dakika), 150 µl sodyum fosfat tamponu (0,1 M pH 8), 1000 µl AChE enzimi (0,1 unite/ml) thermomixer yardımıyla 15 dakika boyunca 25°C'de

inkübe edildi. Ardından, 10 µl DTNB çözeltisi (10 mM) ve 10 µl ATCl çözeltisi (14 mM) eklendikten sonra renkli ürün oluşumu gözlemlendi. 10 dakika sonra spektrofotometre ile 412 nm'de ölçüm gerçekleştirildi (Şenol vd., 2010).

3.2.10 Fraksiyonlanmış peptitlerin DPPH tutma aktivitesi testi

Çörek otu protein konsantrelerinin papain enzimi ile 30 dakika hidroliziyle elde edilmiş peptitlerin fraksiyonlanması sonucu 4 ayrı fraksiyon elde edilmiştir. Oda sıcaklığına getirilmiş 0.1 ml fraksiyonlanmış peptit numuneleri (PA, PB, PC, PD), 0.1 ml DPPH çözeltisi (5.3 mg DPPH/100 ml metanol) ile karıştırıldı. Ayrıca yalnızca tampon (potasyum fosfat), tampon ile DPPH, enzim ile DPPH ve protein ile DPPH içeren numuneler de ölçüm için hazırlandı. DPPH içeren tüm örnekler ölçümden önce 15 dakika karanlıkta inkübe edildi. Ardından 515 nm'de zamana bağlı absorbans ölçümü yapıldı. Her bir örnek iki paralel olacak şekilde hazırlandı ve ölçüm yapıldı (Villano vd., 2007).

3.2.11 Peptitlerin tanımlanması

MS analizleri, Acıbadem Üniversitesi Labmed'de gerçekleştirildi (hizmet alımı) ve proje desteği ile finanse edildi.

a) Örnek hazırlığı ve LC-MS/MS analizi

Farklı enzimler ile (tripsin, kimotripsin, termolisin) ile muame edilmiş örnekler, önce 10 mM DTT ile 55°C'de 10 dk inkübe edilerek peptitler redükte edildi. Ardından peptit karışımı oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 20 mM Iodoacetamide (IAA) ile alkile edildi. Örnekler 30 kDa filtrelerden geçirildi. Örnekler üzerinde peptit konsantrasyon tayini yapıldı ve örnekler enjeksiyon başına 1 µg olacak şekilde LC-MS/MS analizi için viallere alındı.

b) LC-MS/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 sensitivite moduna getirilerek, oluşturulan triptik peptitler hidrofobikliklerine göre HSS T3 kolonunda asetonitril gradienti ile fraksiyonlanmıştır. Asetonitril %5-35 aralığında artırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlandı ve elektrospay iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edilmiştir. Analiz esnasında, m/z 50-1950 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplanmıştır. 0,7sn kadar MS analizi gerçekleştirildi ve peptidin bütünü hakkında bilgi toplanmıştır. Ardından 0,7sn kadar MS/MS analizi yapıp peptidin parçalanması ve sekans bilgisinin elde edilmesi



sağlanmıştır. Protein tanımlamaları yapılırken her bir örnek için uygun protein databankları kullanılmıştır.

c) Veri analizi

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

Peptit toleransı fe 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: 250000

Primer enzim: Tripsin, kimotripsin, termolisin

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

3.2.12 ACE ve DPP-IV aktif fraksiyonların özelliklerinin değerlendirilmesi

LC-MS/MS analizi sonucunda ilgili veri tabanları ile karşılaştırmalar yapılarak numunelerde bulunan peptitlerin dizilimleri (sekansları), moleküler ağırlıkları ve muhtemel olarak hangi fındık proteininden köptükleri belirlenmiştir. Buna ek olarak, literatürde tarif edilen bir dizi *in silico* analiz tekniği kullanılarak peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi işlemleri yapılmıştır. Buna göre, analizde kullanılan *in silico* yöntemler şöyle sıralanabilir:

- 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, 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. (2008) çalışmasına uygun olarak belirlenmiştir.
- Son olarak, biyoaktivitenin gözleendiği 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.

3.2.13. Gıda uygulamaları ve ürün analizleri (FİSKOBİRLİK tesisleri)

Üç farklı enzim ile üretilen hidrolizatlara ait 3 farklı fraksiyon (PAF4, BRF10, PEF6) ve küspeden izole edilen fındık proteini yüksek aktiviteye sahip olması nedeniyle Fiskobirlik'e ürün denemesinde kullanılmak üzere götürülmüştür. Şekil 8'de numunelerin hazırlanışı gösterilmektedir. Projede üretilen biyoaktif peptit fraksiyonları, firma prosedürlerine uygun olarak ürünlerde kullanılmıştır. Peptit ürünlerinin kakao lu fındık kreması ve fındık ezmesi ürünlerinde kullanılmasına karar verilmiştir. Eklenen peptit fraksiyonlarının ürün özelliklerine etkisini incelemek amacıyla yine firma prosedürlerine uygun olarak duysal, kimyasal ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır.



Şekil 8. FİSKOBİRLİK tesislerinde değerlendirilen örneklerin liyofilize edilmesi.

3.2.13.1. Kakaolu Fındık Kreması Üretimi

Fabrika prosesindeki kakaolu fındık kreması üretim akım şeması Şekil 9'da verilmiştir. Bu prosedürlere uygun şekilde ürünler düşük gramajlarda hazırlanmıştır.

Ham madde besleme odası



Mikserde karıştırma



İncelticiler





Konçlama (45-50 °C, 4 saat)





Stok tankı (40-50 °C)



Dolum



Tartım-Gramaj





Folyolama



Kapak kapatma



Etiketleme





Şoklama



Kolileme

Şekil 9. %16 Nuga (kakaolu fındık kreması) üretim akış şeması.

200 gram üretilen örnek için belirlenen reçete:

- 181.3 g flake (Toz mix: 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 10'da manuel yapılan konçlamanın farklı aşamalarındaki ürünün fiziksel yapısının değişimi görülmektedir.



Şekil 10. Manuel konçlama esnasında ürünün fiziksel ve tekstürel değişimi

Üretilen ürünlerde fındık proteini %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.

3.2.13.2. Fındık ezmesi üretimi

Fabrika prosesindeki fındık ezmesi üretim akım şeması Şekil 11'de verilmiştir. Bu prosedürlere uygun şekilde ürünler düşük gramajlarda hazırlanmıştır.



Kavrulmuş fındıkların otomatik olarak seçilmesi



Kavrulmuş fındıkların manuel olarak seçilmesi

↓
Kavrulmuş fındık

↓
Kristal toz şeker



Silo



Silo



TÜBİTAK

Pudra değirmeni



Kıyma makinesi



Dolum haznesi





Kavanoz dolum





Tartım-Gramaj



Kapak kapatma

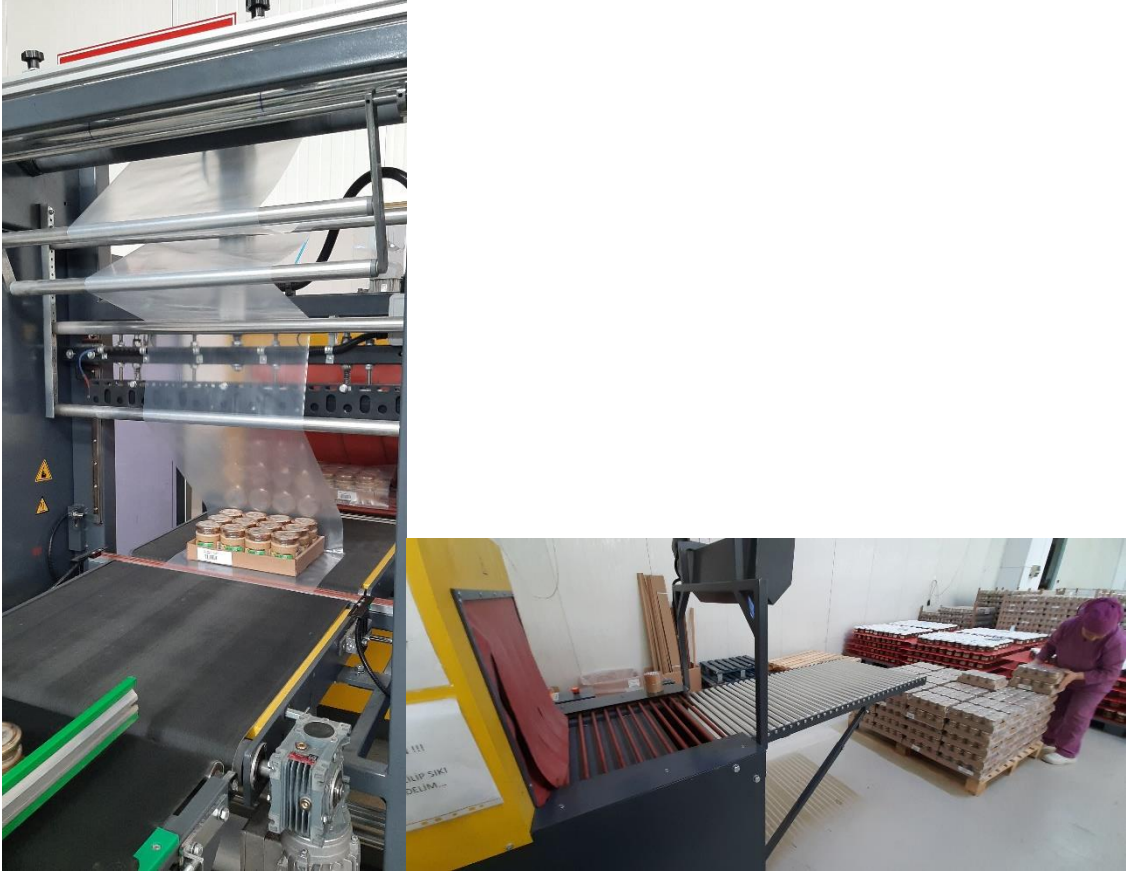


Güvenlik bandının takılması



Etiketleme





Ambalajlama ve Kolileme

Şekil 11. %70 Fındık ezmesi üretim akış şeması.

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

Üretilen ürünlerde fındık proteini %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 konçlama öncesinde ilave edilmiştir.

3.2.13.3. 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 ile yapılmıştır (Şekil 12).



Şekil 12. Hızlı nem tayin cihazı

Asit analizi, TS EN ISO 660:2010 (TSE, 2010) prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Sonuçlar 100 g yağda oleik asit cinsinden bulunmuştur.

Peroksit analizi, TS EN ISO 3960 (TSE, 2010) prosedürüne uygun olarak yapılmıştır.

Yağ tayini, ürünlerin pres ile yağının çıkartılarak Gerhart Soxhlet yağ tayin cihazında çalışılmasıyla yapılmıştır. Şekil 13 üzerinde yağ çıkarmak için pres sistemi ve Gerhart Soxhlet yağ tayin cihazı gösterilmiştir.



Şekil 13. Pres aleti ve Gerhart Soxhlet yağ tayin cihazı

Aflatoxin analizi, HPLC Metodu ile AOAC 999.07 yöntemine (AOAC, 2000) uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 14). Laboratuvara gelen örnekler su ile 1/1 karıştırılarak 5 lt kapasiteli blenderda (Waring) homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler AOAC 999.07 numaralı akredite metoda (AOAC, 2000) uygun olarak immuno-affinity kolondan geçirilmiş ve HPLC cihazında kolon sonrası türevlendirme ile miktar tayini yapılmıştır (min tespit edilebilir seviye: B1> 0,04ng/g, Toplam > 0,1 ng/g).



Şekil 14. Aflatoksin analizinde kullanılan HPLC sistemi.

Mikrobiyolojik analizler

Çalışmalarımızda kullanılan temel ham madde olan fındığa yapılan bir dizi mikrobiyolojik analiz bulunmaktadır. Bu bağlamda kullanılan besiyeri ortamları şöyle sıralanabilir:

Toplam bakteri (PCA-35 °C 48 saat)

Maya-Küf (YGC Agar-25 °C 5-7 gün)

Koliform (Compcat Dry EC. 35±2 °C 24 saat)

Escherichia coli (Compcat Dry EC. 35±2 °C 24 saat)

Staphylococcus aureus (Compcat Dry - SA 35±2 °C 24±2 saat)

Salmonella 25g. Da (Compcat Dry - SL 35±2 °C 24±2 saat)

3.2.14. Ürünlerin alerjenisite testleri

Alerjenisite analizleri, LTS Laboratuvar Hizmetleri'nde gerçekleştirilmiştir (hizmet alımı). Bu analizler, söz konusu akredite laboratuvarın prosedürlerine uygun olarak ticari ELİSA kiti olan Ridascreen® FAST Hazelnut (RBiopharm, Almanya) ile yapılmıştır. Örnekler yoğun fındık içeriğinde olduğundan gerekli hallerde numuneler seyreltilerek ölçüm yapılmıştır.

3.2.15. 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 (Şeki 15). Gıda matriksinden 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 ısıtıcı manyetik karıştırıcıda simüle edilmiş gastrik sıvı ortamına (“simulated gastric fluid”, SGF) tabi tutulacaktır. Buna ek olarak, bu kompartmanlardan 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 homojen hale getirilmiştir (blender). SSF çözeltisinde hazırlanan alfa-amilaz çözeltisi karışıma eklenmiştir (human saliva Type IX-A, 1000-3000 U/mg protein, Sigma-Aldrich) (0.5 ml, 290 U/ml). Bu karışıma son olarak 25 µl 0.3 M CaCl₂ ve 975 µl su eklenmiş ve karışım tekrar 10 dakika süre ile karıştırılmıştır.

Mide aşaması: 10 ml sıvı numune ya da oral bolus 7.5 ml SGF ile karıştırılmıştır. Bu karışıma 1.6 ml pepsin stok çözeltisi (pepsin from porcine gastric mucosa, 3200-4500 U/mg, Sigma-Aldrich), 5 µl 0.3 M CaCl₂, 0,2 ml 1 M HCl (pH değerini pH 3'e düşürmek için) ve 695 µl su eklenmiştir. pH:3 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 (pancreatin from porcine pancreas, Sigma-Aldrich). 2,5 ml 160 mM taze hazırlanmış safra (bile bovine, Sigma), 40 µl 0.3 M CaCl₂ ve 0,15 ml 1 M NaOH bu karışıma katılmış ve pH değerinin pH 7 olması hedeflenmiştir. Son olarak 1,31 ml su katılarak karışım tamamlanmıştır. pH:7 olarak ayarlanmış ve karıştırma işlemi 2 saat sürmüştür. İşlem sonunda örnekler 100 °C'de 15 dakika bekletilerek enzimatik reaksiyon inaktive edilmiştir.



Şekil 15. Ürünlerin sindirim testlerinin yapılması

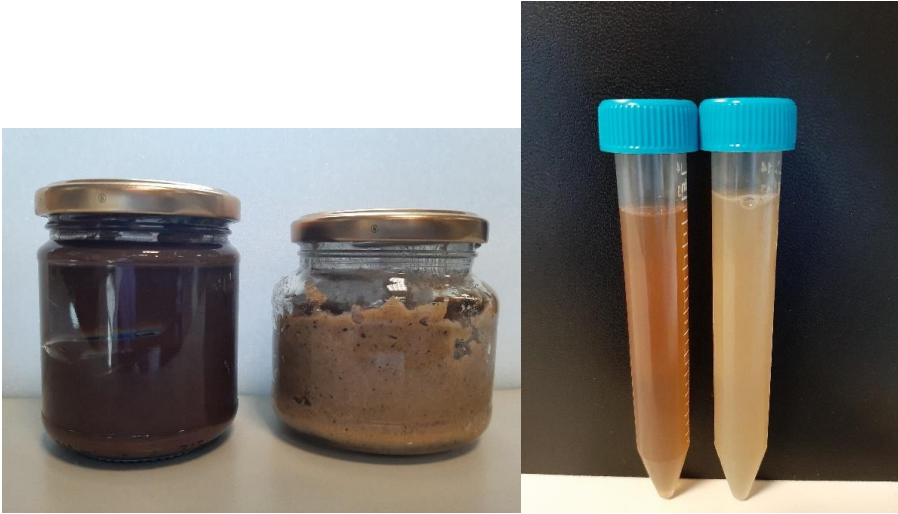
Sindirilmiş örnekler analizlerde kullanılmak üzere, önce kaba filtre kağıdından geçirilerek (Şekil 16) sonra +4 °C'de 4000xg'de 30 dakika santrifüj edilerek katı kısımlarından ayrılmıştır (Şekil 17). Sıvı örnekler 0.22 µm CA şırınga filtreden geçirilerek analizlerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır (Şekil 18).



Şekil 16. Sindirilmiş ürünlerin kaba filtreden geçirilmesi



Şekil 17. Sindirilmiş ürünlerin kaba filtreden sonra santrifüj edilmesi



Şekil 18. Ürünlerin sindirim öncesi ve sindirim sonrası görünümü

3.2.16. Ürünlerin biyoaktivite testleri

Peptit fraksiyonları için biyoaktivite testleri uygulanarak biyoaktif peptitlerin üretim ve simüle edilmiş gastrointestinal sindirim sürecinde biyoaktif özelliklerinin değişimi incelenmiştir. Bu yöntemlerin uygulanması esnasında, ACE önleyici aktivite testi ile birlikte DPP-IV önleyici aktivite ve antioksidatif aktivite testleri önceki bölümlerde tarif edildiği şekliyle uygulanmıştır.

3.2.17. İstatistiksel analiz

Projede yürütülecek olan tüm deneyler en az iki paralel ve iki tekerrürlü olarak yapılmıştır. Deney sonuçları, gerektiğinde varyans ve regresyon analizleri ($p < 0,05$ önem düzeyi) üzerinden değerlendirilmiştir.

4 BULGULAR ve TARTIŞMA

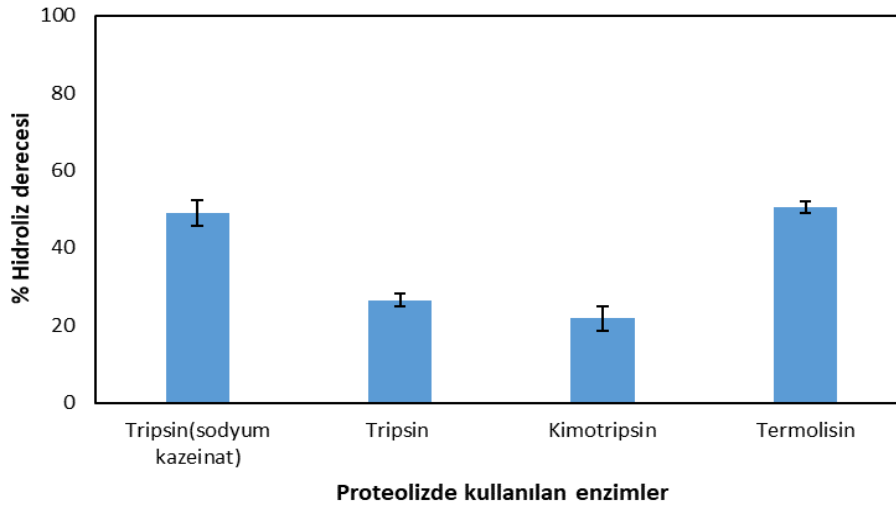
4.1 Fındık proteinlerinin tripsin, kimotripsin ve termolizin muameleleri ile ilgili çalışmalar

4.1.1 ACE-önleyici aktivite

Bu kısımda yapılan çalışmaları içeren bir makaleye ait gönderim “European Food Research and Technology” dergisinde yayınlanmıştır. Bu doküman ve EK-1 kapsamında bilgilerinize sunulmaktadır. Konu ile ilgili olarak ekibimizin ön çalışmalarını içeren bir adet ulusal (ULAKBİM) makale de EK-2 kapsamında sunulmaktadır.

4.1.1.1 Hidroliz derecesi

Farklı enzimlerle 18 saat muamele edilen fındık proteinlerinin hidroliz derecesi Adler-Nissen (1979) tarafından tarif edilen Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 19 üzerinde gösterilmektedir. Referans örnek olarak sodyum kazeinat kullanılmıştır.



Şekil 19. TNBS yöntemiyle belirlenen, çeşitli proteazlar tarafından hidrolize edilmiş fındık posası proteinlerinin hidroliz derecesi. Tripsinolizde referans örnek olarak sodyum kazeinat kullanılmıştır (n=3).

Bu araştırmada elde edilen %1 konsantrasyondaki tripsin, kimotripsin ve termolisin hidrolizatları sırasıyla %26,43±1,7, % 21,8±3,1, % 50,4±1,5 hidroliz derecesine sahiptir. Referans örnek sodyum kazeinatın hidroliz derecesi %49±3,3 bulunmuştur ve Nielsen vd. (2001) tarafından belirtilen %42-%62 değerler aralığındadır. Tripsin, kimotripsin ve termolisin hidrolizatlarının değerleri karşılaştırıldığında termolisin enziminin diğerlerine kıyasla fındık proteinlerini belirgin ölçüde daha fazla hidroliz ettiği görülmektedir. Bu durum termolisin enziminin yüksek bir aktiviteye sahip olmasıyla da açıklanabilir (Gülseren, 2018). Mevcut değerlere göre tripsin enzimi fındık proteinini parçalamada sodyum kazeinata göre daha düşük aktivite göstermiştir. Ancak bu durum kısmen TNBS yönteminin sadece serbest amino gruplarının miktarını vermesinden kaynaklanabileceği de bildirilmiştir (Polychroniadou, 1988).

4.1.1.2 Peptit numunelerinin anyon değişimi yöntemi ile fraksiyonlanması

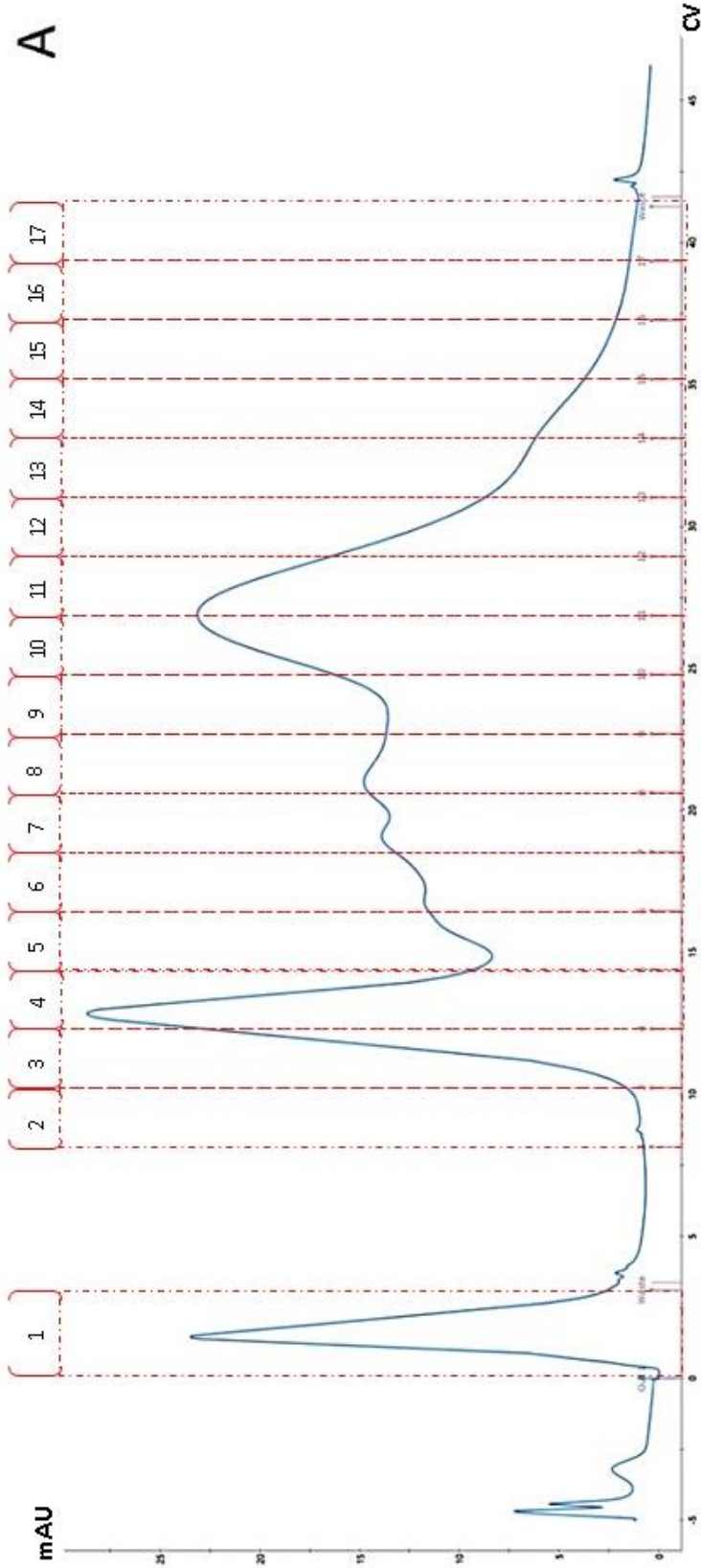
Hidroliz edilen fındık proteinleri AKTA- Pure 25-L1 FPLC kromatografi sistemi (GE Healthcare, Buckinghamshire, İngiltere) kullanılarak fraksiyonlanmıştır. Fraksiyonlama işlemi için iyon değişimine dayalı kolonlar (HiTrap DEAE FF, Capto-Q, Capto DEAE, Capto-S) ve hidrofobik etkileşim kolonlarında (HiTrap Phenyl FF, HiTrap Butyl-S FF, HiTrap Octyl FF) ön denemeler yapılmıştır. Fındık örnekleri için anyon değişimine dayalı kolonlarda bağlanma oranının yüksek, elüsyon işleminin kolay olması ve elde edilen fraksiyonların aktivite testlerinde ön işlem gerektirmemesi sebebiyle fraksiyonlama işlemi için HiTrap Capto Q (GE Healthcare, Buckinghamshire, İngiltere) anyon değişimi kolonu ile yürütülmüştür. Bu hazır kolonda boyut farklılığın fraksiyonlamaya etkisinin olup olmadığını incelemek amacıyla 1 ml ve 5 ml yatak hacimli iki farklı kolon boyutu denenmiştir.

Tripsin, kimotripsin ve termolisin hidrolizatlarından peptitlerin fraksiyonlanması için elüsyon işlemi 20 mM Tris-HCl (pH 8.3) tamponu kullanılarak 32 CV boyunca 0,6 M NaCl konsantrasyonuna kadar tuz konsantrasyonu lineer bir şekilde artırılmış ve ayırım, 280 nm UV dalga boyunda takip edilmiştir. DPP-IV önleyici aktivite testi için ayrı olarak 5 ml yatak hacimli kolonda 100 mM Tris-HCl pH:8 tamponu kullanılarak aynı şekilde fraksiyonlama işlemi yapılmıştır. Enzimatik hidroliz süreçlerinde elde edilen numuneler, Şekil 19 ve Şekil 20 üzerinde gösterildiği gibi ayrımlara tabi tutularak 2 kolon hacminde (CV) fraksiyonlar deney tüplerine alınmıştır. Kolona bağlanmayan peptitler deneyin başında ayrı bir tüpe toplanmıştır ve bu tüpler “out” fraksiyonu olarak isimlendirilmiştir. Her bir hidrolizat örneğinden 17 fraksiyon alınmıştır. Fraksiyonlar alınma sıralarına göre numaralandırılmış ve kullanılan enzime göre harflendirilmiştir (tripsin:T, kimotripsin:C, termolisin:E). Örneğin kimotripsin hidrolizatının 3. fraksiyonu için C3 adı verilmiştir. Alınan peptit fraksiyonları aktivite testlerinde kullanılmak üzere -20°C de kısa süreli depolanmıştır.

İyon değişim kromatografisi, proteinlerin yük türünü (katyonik veya anyonik) ve yük gücünü (güçlü veya zayıf anyonik-katyonik) temel alarak ayırım sağlamaktadır. İyon değişim kromatografisinde yüklü bileşikler ile reçineler arasındaki etkileşim iyonik bileşiğin boyutu, polarizasyon derecesi, yüzeyindeki yükü, reçinenin yapısı, çapraz bağlanma derecesi, iyon değişim kapasitesi, mobil fazın yapısı ve konsantrasyonu gibi özelliklerden etkilenmektedir (Pohl vd. 1997). Buna ek olarak kolon boyutunun da fraksiyonlamaya etkisi olduğu düşünülmektedir. Aynı tip kolonun farklı iki boyutunda aynı şekilde yapılan fraksiyon çalışmalarında Şekil 18’de görüldüğü üzere benzerliklerin yanı sıra farklılıklar da meydana gelmiştir. Özellikle 5 ml yatak hacimli Capto-Q kolonunda yapılan çalışmada tüm hidrolizat örneklerinde elüsyon işlemi 1 ml yatak hacimli kolona göre daha hızlı bir ayırım sağlamıştır. Buna bağlı olarak fraksiyonlanan örneklerin içerdiği

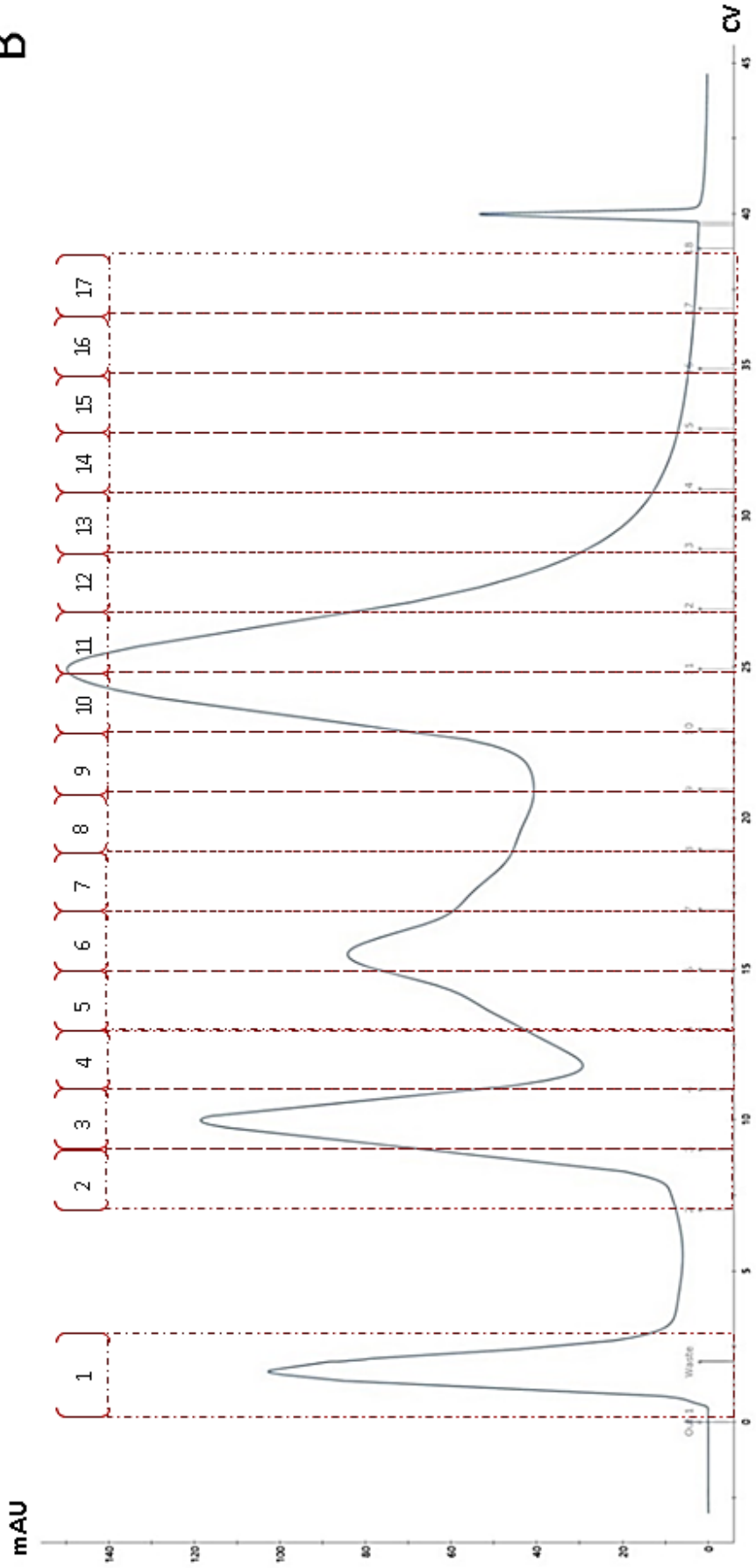


bileşik çeşidi ve miktarlarında da farklılıklar olması beklenmektedir. Elde edilen şekillerin her birinin aynı kolon ile yapılan ayrımlarda dahi belirgin ölçüde farklılık arz etmesi, farklı enzimlerin yine belirgin ölçüde farklı parçalanmalara sebebiyet vermesi anlamına gelmektedir. Buna bağlı olarak, elde edilen fraksiyonların da kompozisyonlarının farklı olması ve farklı düzeylerde biyoaktivite göstermeleri mümkün olacaktır.

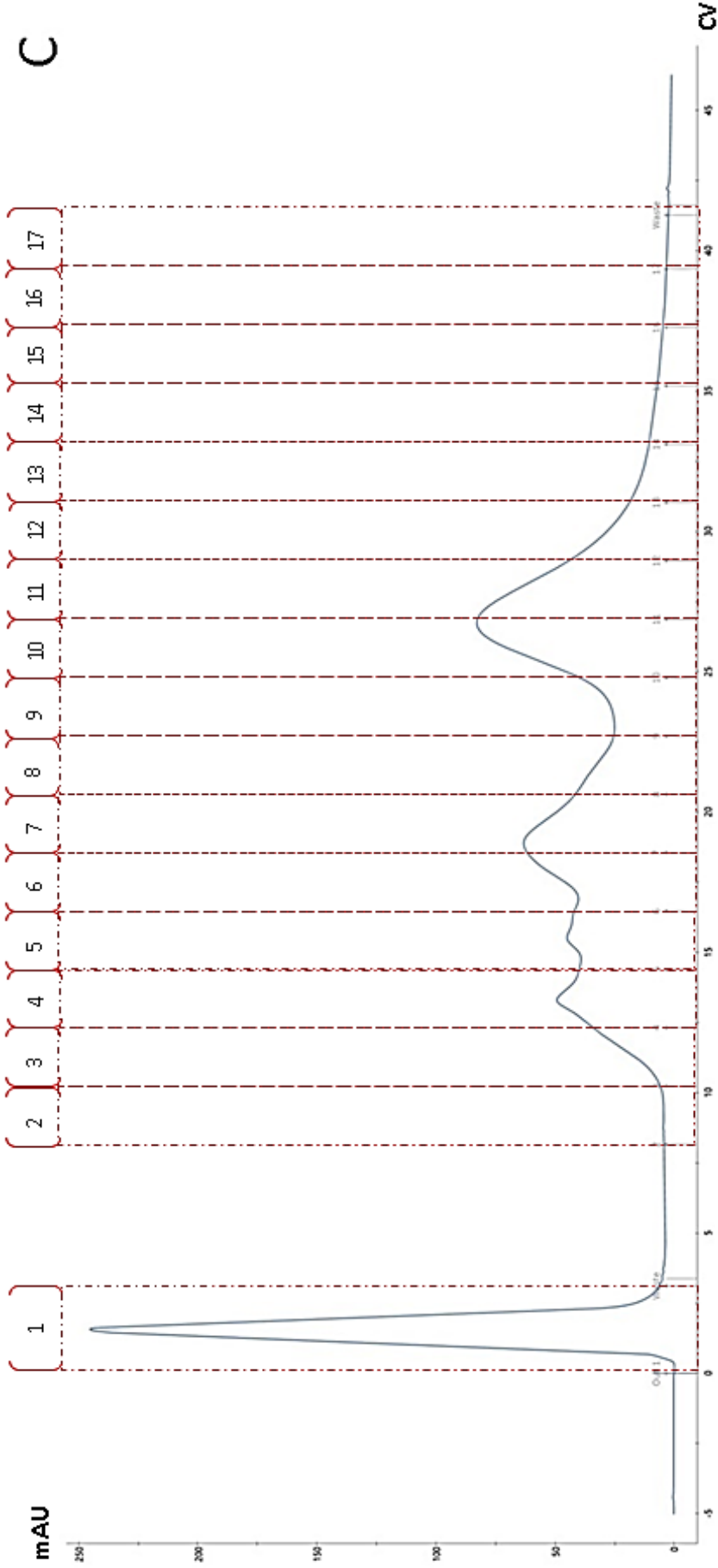


Şekil 19. Hidrolizat örneklerinin 20 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak 1 ve 5 ml yatak hacimli Canto-Q anyon değişim kolonunda fraksiyonlanması (X: kolon hacmi-CV, Y: Absorbans- 280 nm). (A, B) Kimotripsin hidrolizatlarının, (C, D) Termolisin hidrolizatlarının, (E, F) Tripsin hidrolizatlarının sırasıyla 1 ve 5 ml yatak hacimli kolonlarda 32 CV elüsyonu.

B

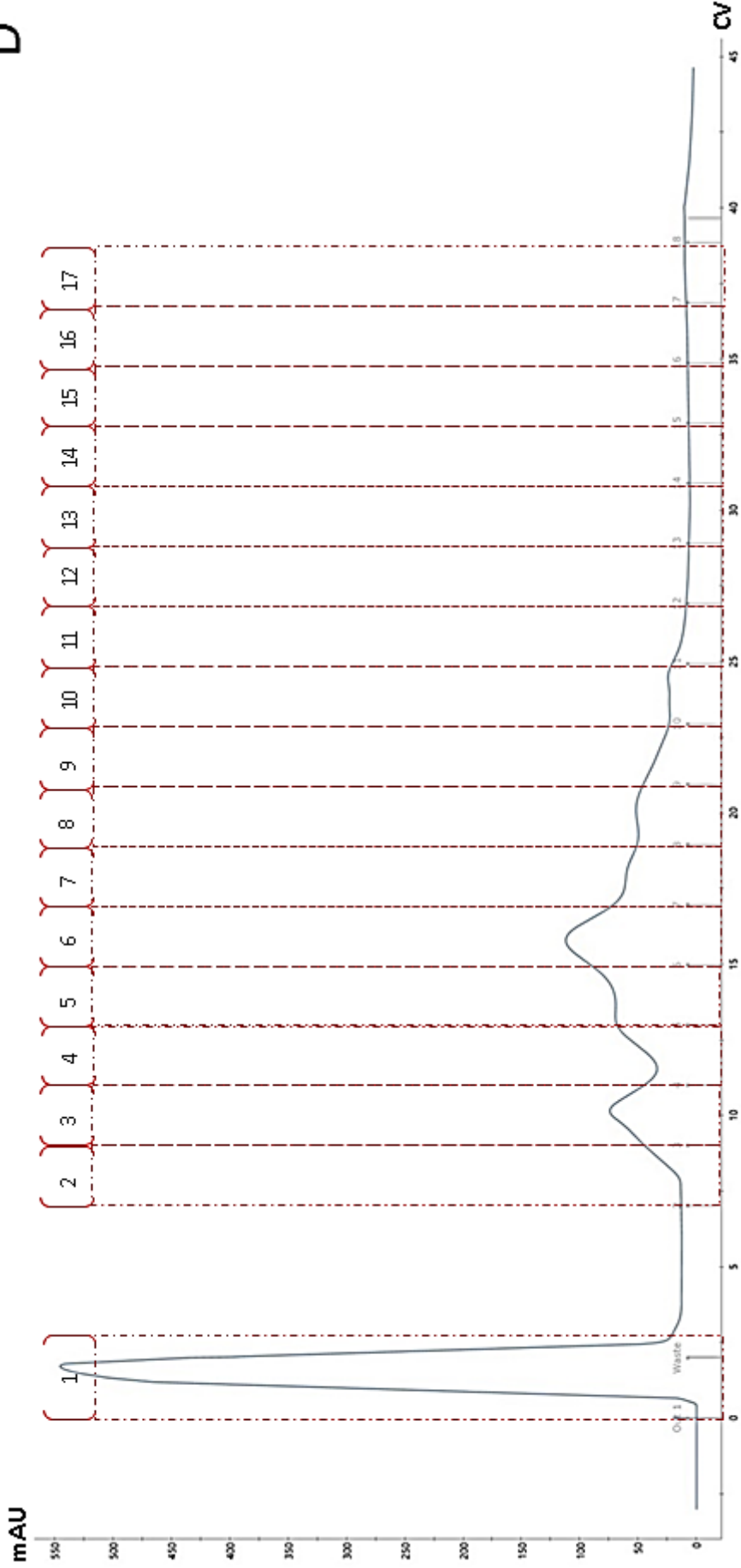


Şekil 19 devam ediyor

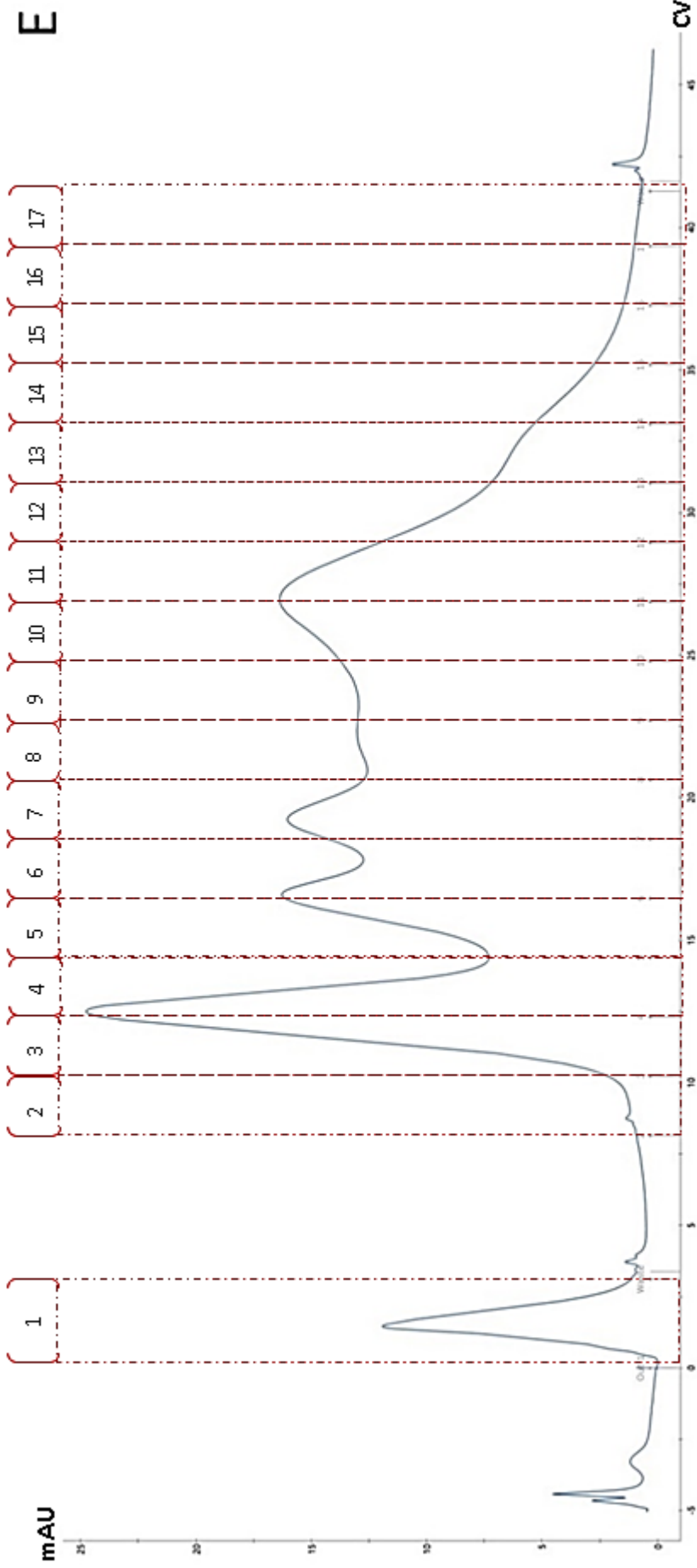


Şekil 19 devam ediyor

D

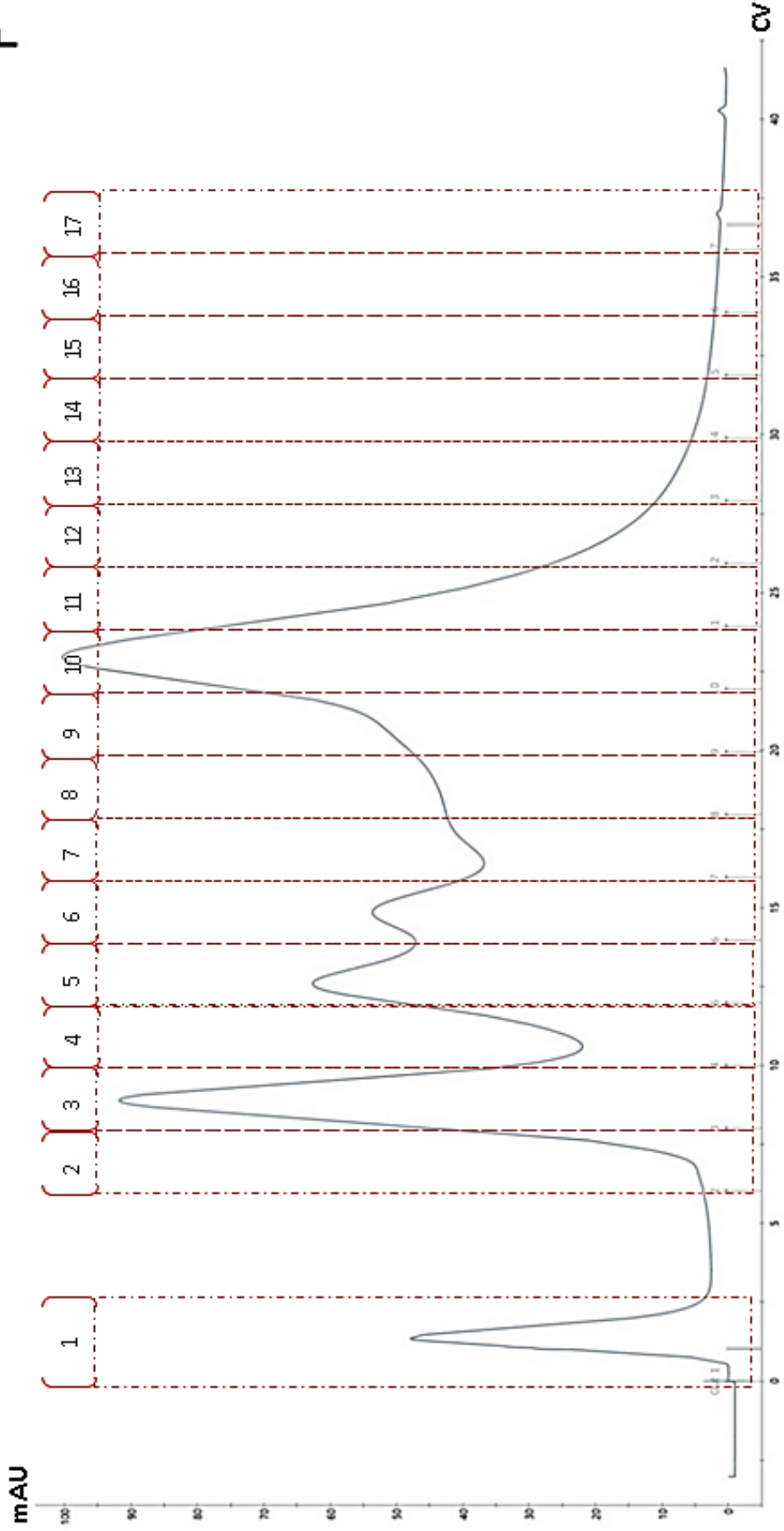


Şekil 19 devam ediyor

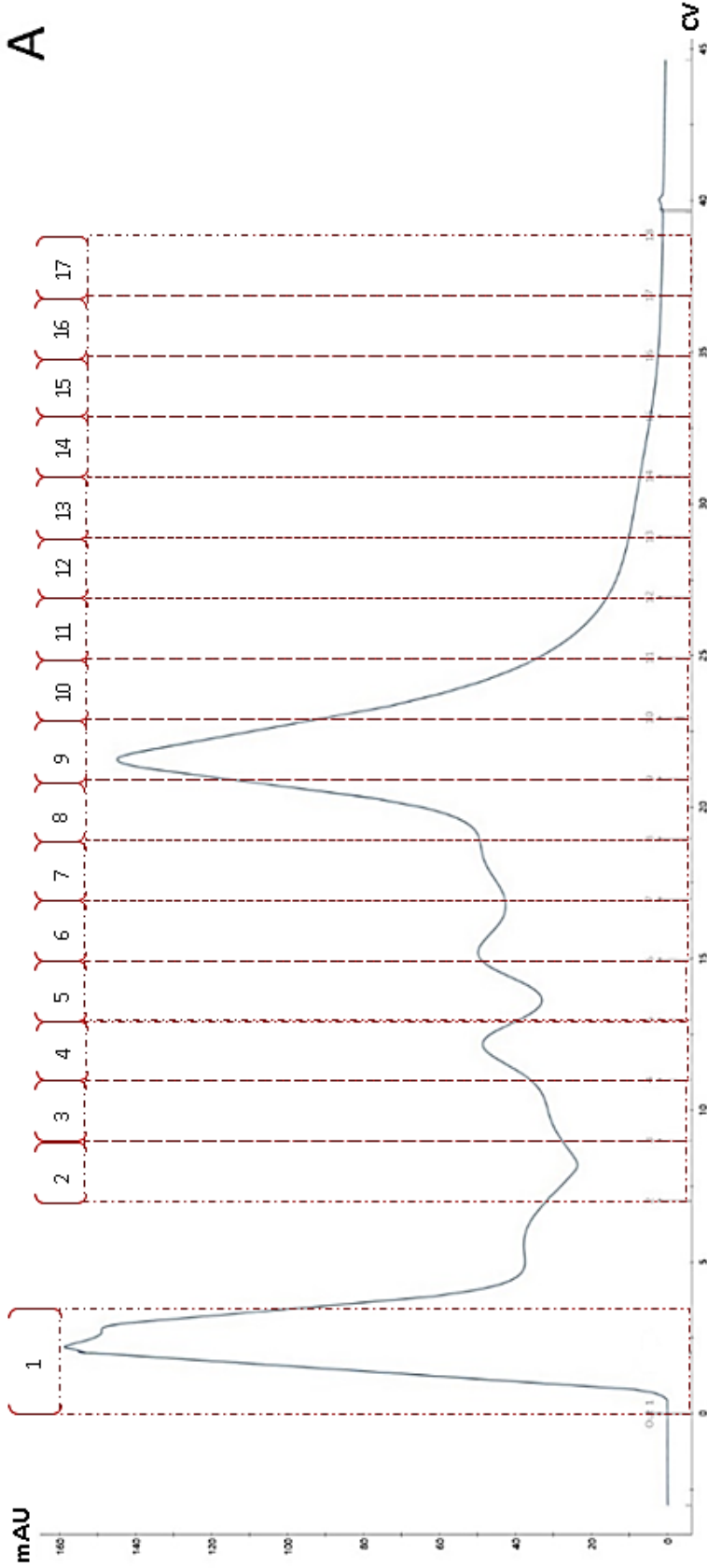


Şekil 19 devam ediyor

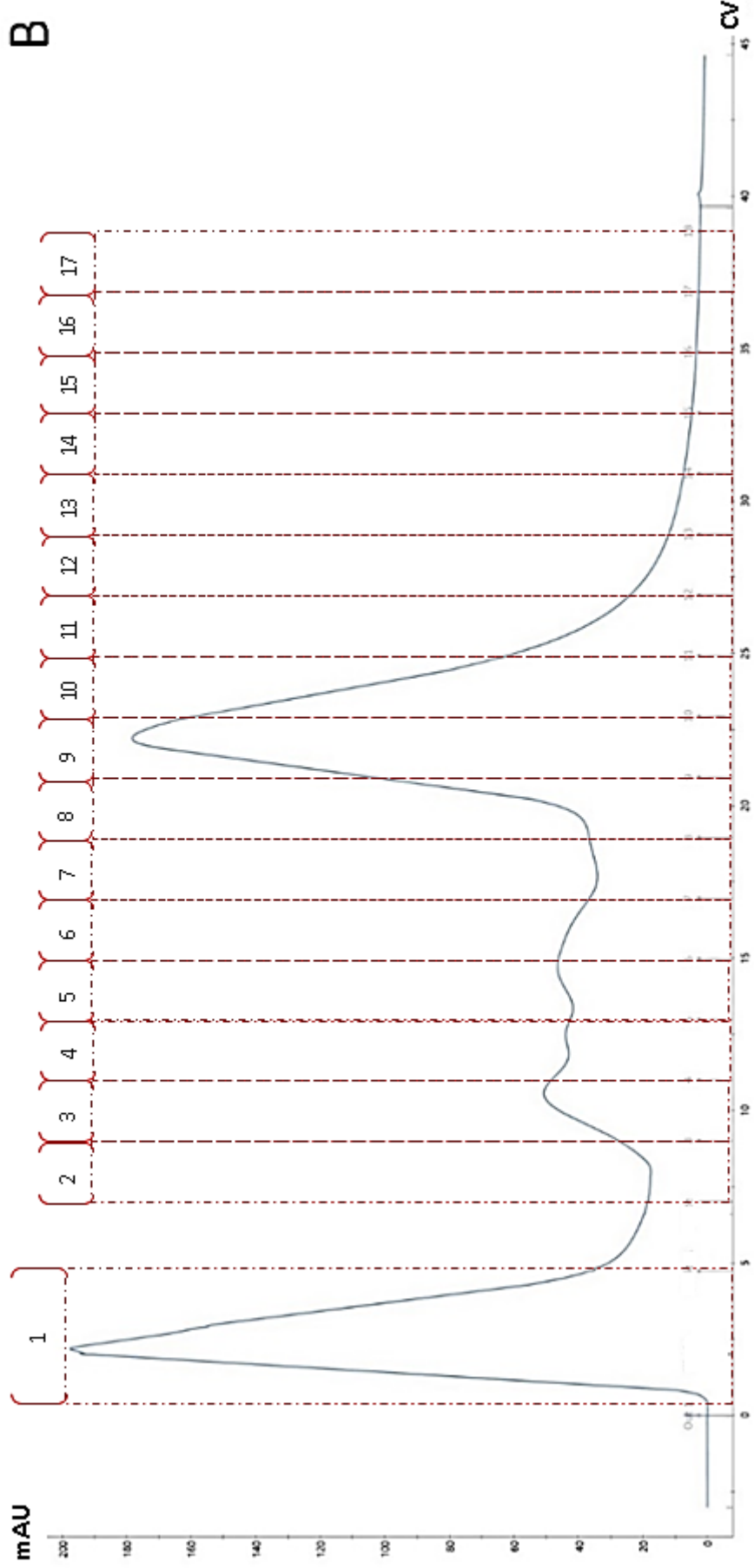
F



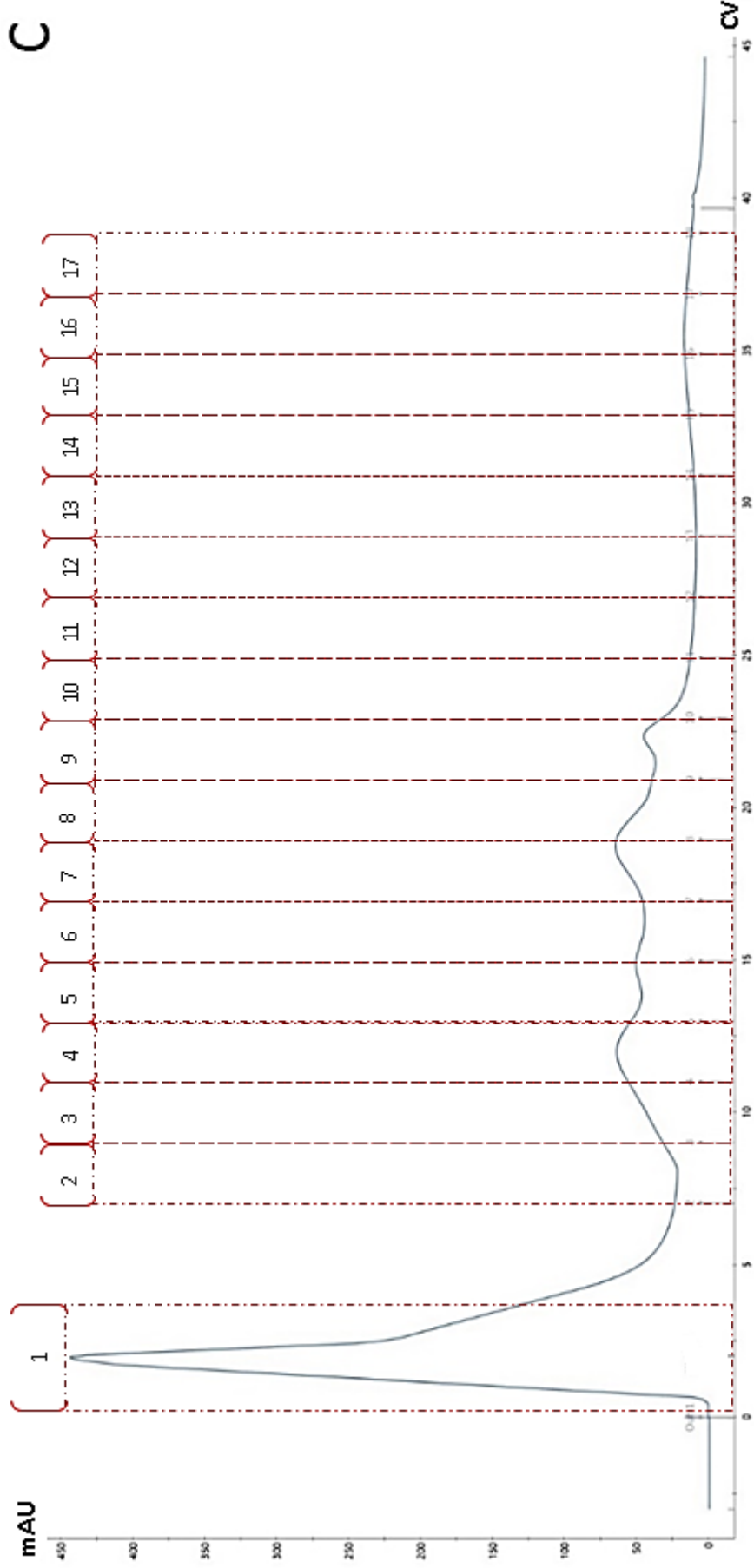
Şekil 19 devam ediyor



Şekil 20. Hidrolizat örneklerinin 100 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak 5 ml yatak hacimli Capto-Q anyon değişim kolonunda fraksiyonlanması (X: kolon hacmi-CV, Y: Absorbans-280 nm). (A) Tripsin hidrolizatlarının 32 CV elüsyonu, (B) Kimotripsin hidrolizatlarının 32CV elüsyonu, (C) Termolisin hidrolizatlarının 32CV elüsyonu.



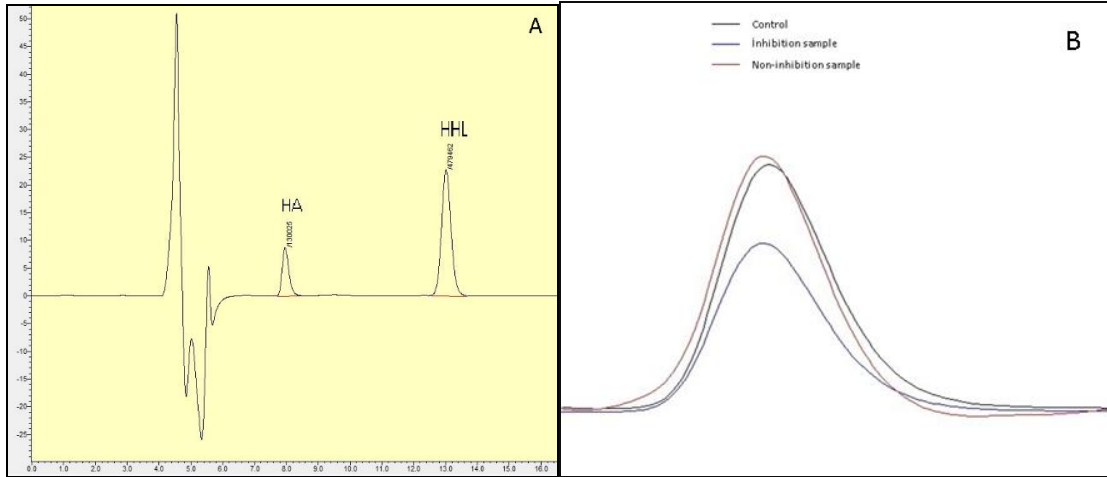
Şekil 20 devam ediyor



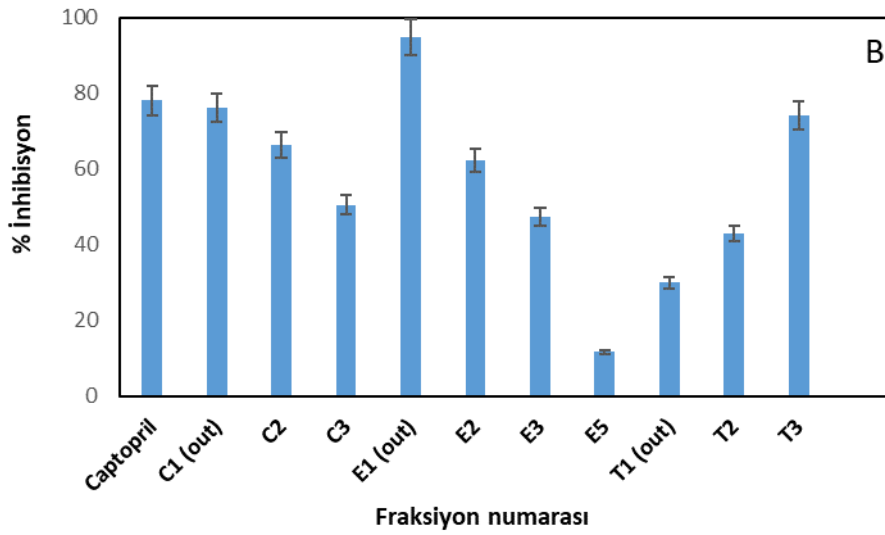
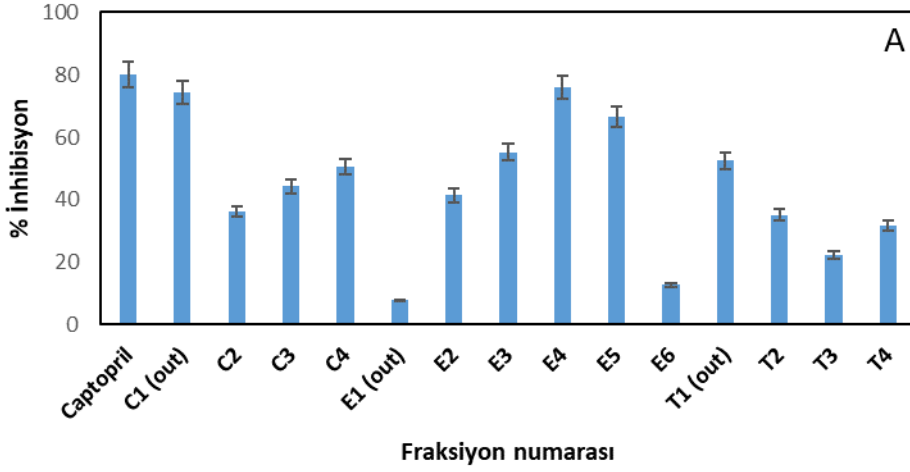
Şekil 20 devam ediyor

4.1.1.3 ACE-önleyici aktivite

Bu çalışmada fındık proteinlerinin antihipertansif özelliğini belirlemek amacıyla yapılan ACE-önleyici aktivite testi için Capto-Q 1 ml ve 5 ml kolon hacmine sahip iki kolondan da elde edilen fraksiyonlar, karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır. İyon değişimi kromatografisi yöntemine uygun olarak hazırlanan hidrolizat fraksiyonları, her 3 enzim için ayrı ayrı hazırlanarak ACE-önleyici aktivite testlerinde değerlendirilmiştir (Şekil 21). Çalışmada uygun bir HPLC yöntemi ile ACE inhibisyon aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Substrat olarak kullanılan Hippuril-His-Leu (HHL) bileşiğinin ACE etkisiyle parçalanması ile açığa çıkan hippürik asit (HA) konsantrasyon değerleri dikkate alınarak hesaplama yapılmıştır (Şekil 21A). İnhibitör içermeyen kontrol örneğinin maksimum HA konsantrasyon değerine sahip olduğu varsayılmıştır. Fraksiyon örneklerinin HA konsantrasyon değerleri kontrol örneği ile karşılaştırılarak örneklerin %ACE inhibisyon etkisi belirlenmiştir (Şekil 21B). İnhibisyon gösteren fraksiyon örneklerinin % ACE inhibisyon değerleri Şekil 22 üzerinde sunulmuştur.



Şekil 21. ACE testi HPLC kromatogramı **(A)** HA ve HHL bileşiklerine ait alıkonma kromatogramı, **(B)** HA molekülünün miktarına bağlı inhibisyon karşılaştırmasını içeren örnek kromatogram (X: zaman, Y: Absorbans-228 nm)



Şekil 22. Çeşitli proteazlar tarafından hidrolize edilmiş fındık posası peptit fraksiyonları için ACE inhibisyon aktivitesi. Fraksiyonlama, (A) Capto Q, 1 ml veya (B) Capto Q, 5 ml yatak hacimli kolon kullanılarak yapıldı. ACE inhibisyon testlerinde Kaptopril referans inhibitör olarak kullanıldı. Fraksiyon adları, aşağıdaki gibi kullanılan enzime dayanmaktadır: C; Kimotripsin hidrolizatlarından elde edilen fraksiyonlar (C1,C2,C3,C4). E: Termolisin hidrolizatlarından elde edilen fraksiyonlar (E1,E2,E3,E4,E5,E6). T; Tripsin hidrolizatlarından elde edilen fraksiyonlar (T1,T2,T3,T4). C1(out), E1(out) ve T1(out) kolona bağlanmayan bileşikleri içeren fraksiyonlardır.

Capto-Q 5 ml yatak hacimli kolonda yapılan fraksiyonlamanın daha hızlı gerçekleşmesine bağlı olarak ACE inhibisyonu gösteren bazı bileşiklerin 1 ml yatak hacimli kolona göre daha erken fraksiyonlanması mümkün olmuştur. Bu sebeple 5 ml yatak hacimli kolonda inhibisyon gösteren fraksiyon sayısı, 1 ml yatak hacimli kolona göre daha az olmuştur. Ancak 5 ml yatak hacimli kolonda daha yüksek inhibisyon aktivite gösteren fraksiyonlar toplanmıştır (Şekil 21B). ACE inhibisyon aktivitesi tüm hidrolizat örneklerinde Şekil 22'de gösterildiği üzere kolona bağlanmayan ve/veya zayıf anyonik özellik gösteren bileşiklerin olduğu fraksiyonlar da görülmüştür. Benzer sonuçlar Liu vd. (2018a) tarafından yapılan çalışmada da bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada

katalaz enzimiyle hidroliz edilen ve iyon değişim kromatografisi ile ayrıştırılan fındık peptitlerinde en yüksek ACE inhibisyonu zayıf asidik peptitleri içeren ilk fraksiyonda gözlemlenmiştir. Tüm bu bulgular göz önüne alındığında, özellikle kolona bağlanmayan bileşikler içeren fraksiyonlarda pozitif yüklü amino asitleri içeren peptitlerin varlığı ve ACE inhibisyonuna olumlu etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir araştırmada bazı kazein kaynaklı inhibitörlerde (kasokininler), bradikinin ve bazı sentetik inhibitörlerde pozitif yüklü C-terminal lizin veya arginin varlığının ACE inhibisyonuna önemli ölçüde katkı sağladığı bulunmuştur (Meisel, 1993). Bu durum Ondetti ve Cushman (1982) tarafından belirtilen ACE aktif alan modeline uymamaktadır. Bu sebeple ACE inhibisyon mekanizmasında enzimin katalitik bölgesinden farklı bir anyonik inhibitör bağlanma bölgesinde etkileşimin olduğu iddia edilmektedir (FitzGerald ve Meisel, 2000).

4.1.2 ACE aktif fraksiyonların LC-MS/MS analizi ve *in silico* yöntemlerle değerlendirilmesi

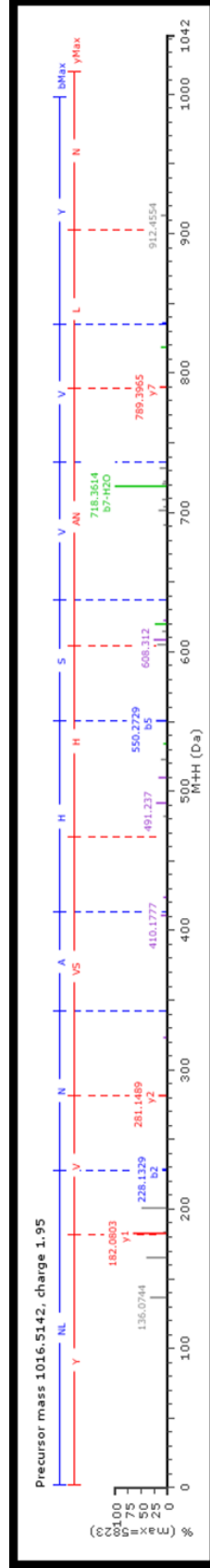
Önceki çalışmalarda ACE aktivitesi gösteren fraksiyonlar toplanarak uygun LC-MS/MS analiz teknikleriyle incelenmiştir (Zent vd. 2020). Çalıştığımız fındık proteinlerinden elde edilen enzimatik hidrolizatların fraksiyonları alındıktan sonra peptit yapılarını aydınlatmak için LC-Q-TOF-MS sisteminde analizler tamamlanmıştır. Analiz edilen peptit moleküllerinin Uniprot, PLGS, vb. veri bankalarındaki proteinlerle eşleştirerek peptit moleküllerinin yapıları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ancak bazı peptit moleküllerinin yapıları bu yolla belirlenememiştir. LC-MS/MS analizi sonucu elde edilen bazı örnek spektrumlar aşağıda sunulmaktadır (Şekil 23-25). ACE aktif fraksiyonlarda bulunmuş 179 farklı peptit spektrumu olması sebebiyle burada sadece örnek olarak birkaç spektrum verilmiştir.

Uygun tekniklerle dizilimleri belirlenen peptitlerin fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesi literatürde bulunan *in silico* yöntemler kullanılarak yürütülmüştür. Analizde kullanılan *in silico* yöntemler ile ilgili detaylı bilgi, Gereç ve Yöntem bölümünde verilmiştir.

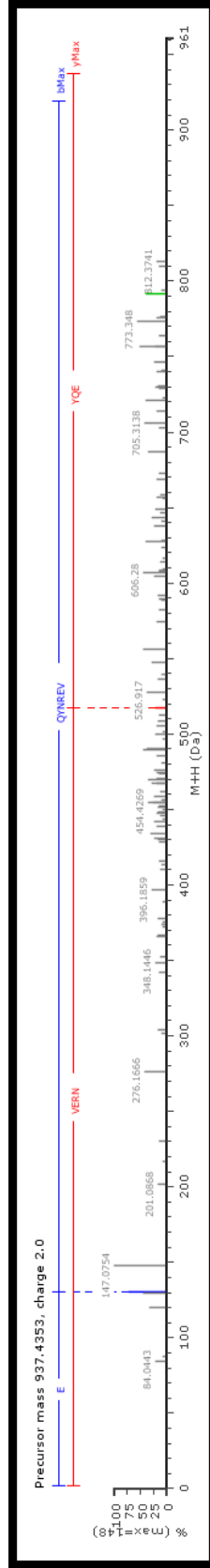
ACE aktif fraksiyonlardan analizi tamamlanmış 179 farklı peptit bulunmaktadır. Tripsin, kimotripsin ve termolisin hidrolizatlarından elde edilen bu peptitlerin değerlendirmeleri ilgili makale kapsamında Ekler bölümünde Ek-1'de verilmiştir. Mooney vd. (2012) referansına göre (PeptideRanker) bu peptitlerin muhtemel biyoaktiviteleri sıralanmıştır. Bunun yanında, Minkiewicz vd. (2008) referansına göre, peptitlerin (eğer varsa) ACE inhibisyon potansiyelleri incelenmiştir. Bu bağlamda hem *in vitro* ACE aktivitesi bulgularan, hem de bu aktiviteleri *in silico* tekniklerce doğrulan peptitlerin ACE



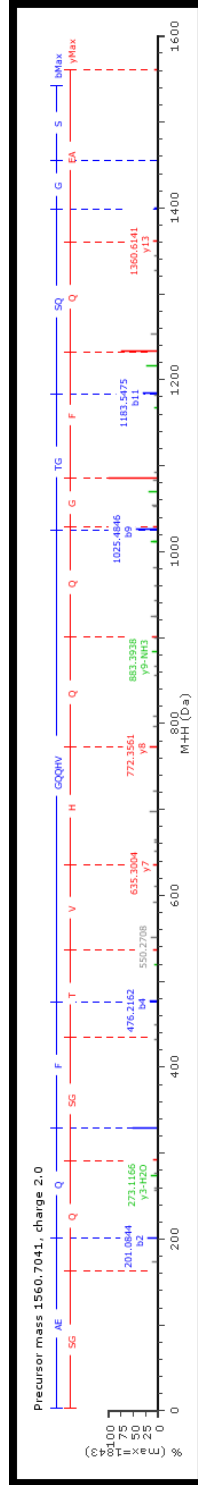
inhibisyon mekanizması incelenmiştir (Trabuco vd. 2012). Her bir hidrolizat için en etkin (muhtemel) aktiviteye sahip peptit sekansları ve PeptideRanker değerleri Tablo 5 üzerinde verilmiştir.



Şekil 23. C2 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum NLNAHSVY peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.



Şekil 24. E2 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum EQYNREV peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.



Şekil 21. T3 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum AEQFGQQHVTGSQGS peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.

Değerlendirmeler sonucunda, aktif fraksiyonlarının tamamına yakınında hem aktif hem de aktif olmayan peptitlerin bulunduğu anlaşılmıştır. Ekler bölümünde verilen tablolar (Ek 1 – Tables S1-S3) üzerinden incelenebileceği gibi 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 fazla aktif peptit içeriğine sahiptir. Yine de bazı istisnalar her iki durum için de söz konusudur. Dolayısıyla, hem out fraksiyonlarda bazik olmayan peptitler görülmüş, hem de out olmayan fraksiyonlarda sayıca az bazik peptitler bulunmuştur. Bu durum, peptitlerin birbirleri ile etkileşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca kısa fraksiyonlama aralığına bağlı olarak aynı peptit sekansına sahip bazı ardışık fraksiyonlar da gözlemlenmiştir. Örneğin, gözlenen peptitlerin C2 ve C3 fraksiyonları için, 1 peptit dışında, ortak olduğu anlaşılmıştır.

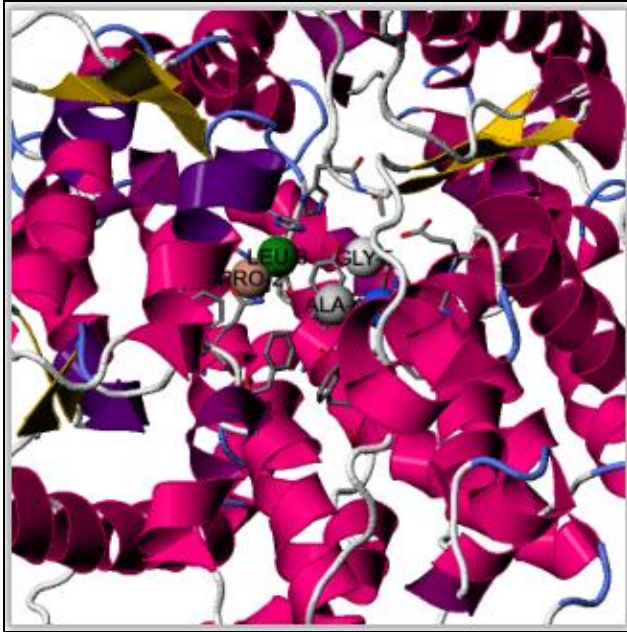
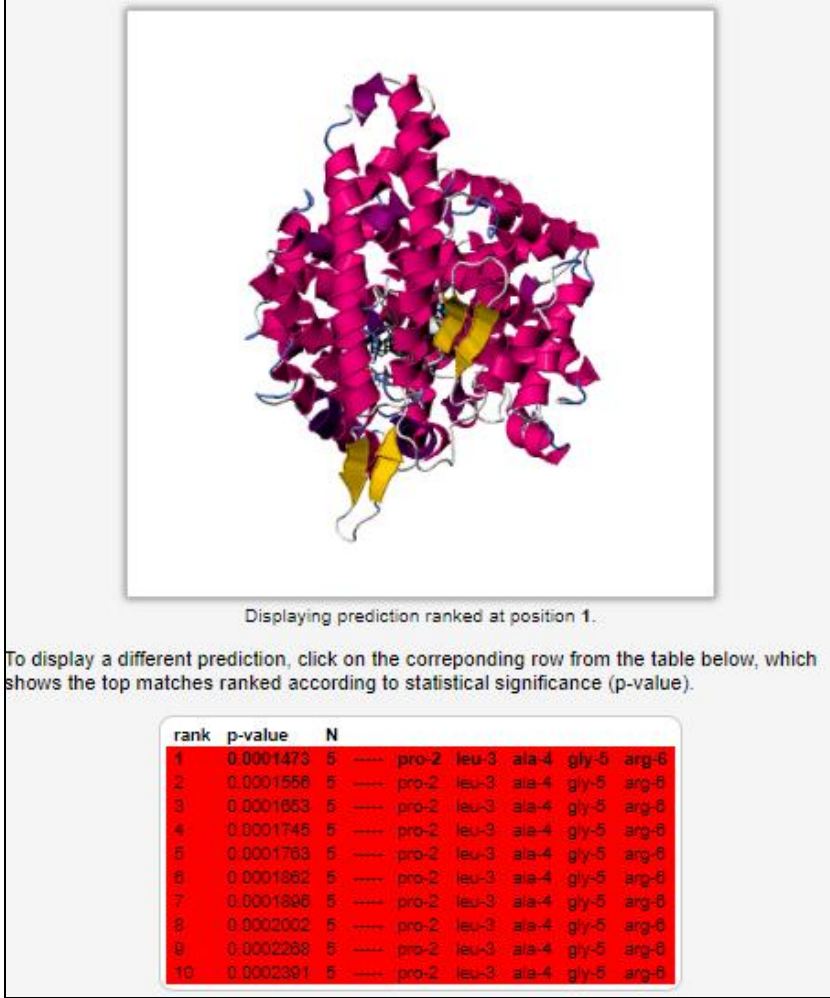
Peptitlerin bazılarının antimikrobiyal etkiler de dâhil olmak üzere bazı yenilikçi özelliklerinin de olabileceği düşünülmektedir. Genel olarak, veri tabanı analizlerinin sonuçlarından da anlaşılabilen gibi, bu peptitlerle ilgili bir literatür bulunmamaktadır. Buna ek olarak, elde edilen bazı sinyaller veri tabanlarında olan proteinlerle eşleşmemiştir. Dolayısıyla bulgularımızın bir kısmı yeni protein ve peptit ürünlerine işaret etmektedir.

Tablo 5. Her bir hidrolizat için en etkin (PeptideRanker değerine göre) peptit sekansları.

Hidrolizat adı	Fraksiyon numarası	Sekanslar	Moleküler ağırlık (g/mol)	Kaynak proteini	Peptide Ranker skoru	pl
Tripsin	T out	SPLAGR	600,3462	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	0,615224	10,1
Kimotripsin	C2 & C3	VPHW	538,2772	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	0.79343	7,37
Termolisin	E out	PGHF	457,2194	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	0,950238	7,1

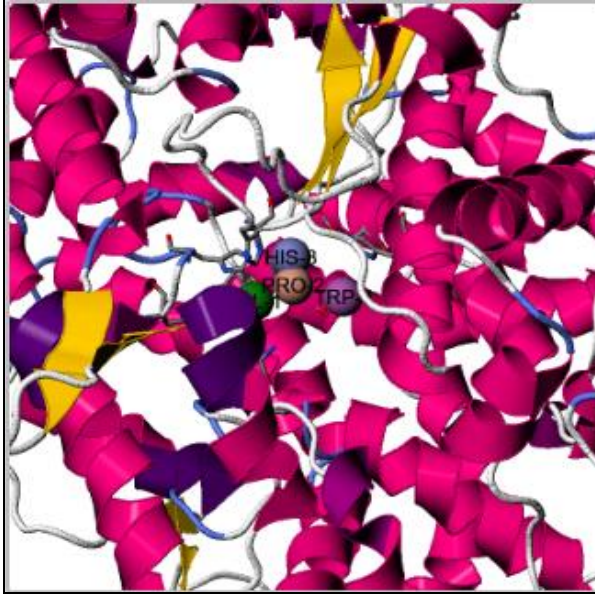
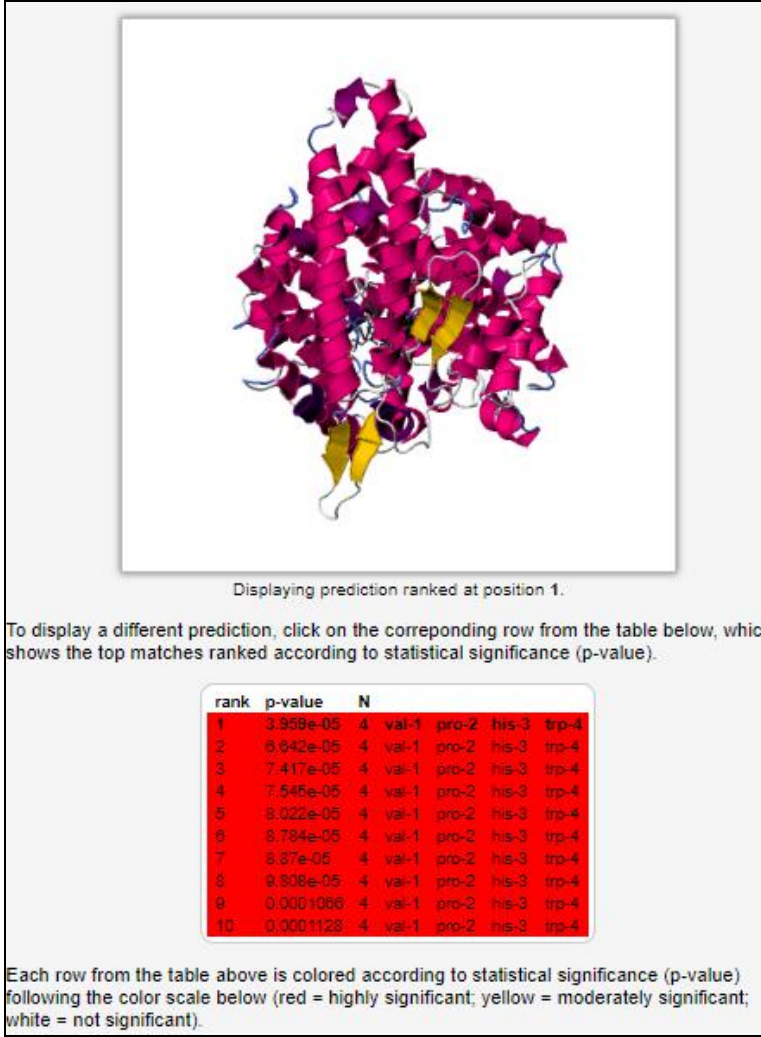
Sekansları Tablo 5 üzerinde verilen peptitlerin ve diğer ACE aktif 189 peptidin daha detaylı verileri Ekler bölümünde verilmiştir (Ek-1). Aşağıdaki şekil ve tablolarda SPLAGR, VPHW ve PGHF peptitlerinin ACE ile etkileşim mekanizması incelenmiş ve bu

inhibitörlerin ACE'nin hangi amino asitleri ile etkileşebileceği özetlenmiştir (Şekil 26-28, Tablo 6-9).

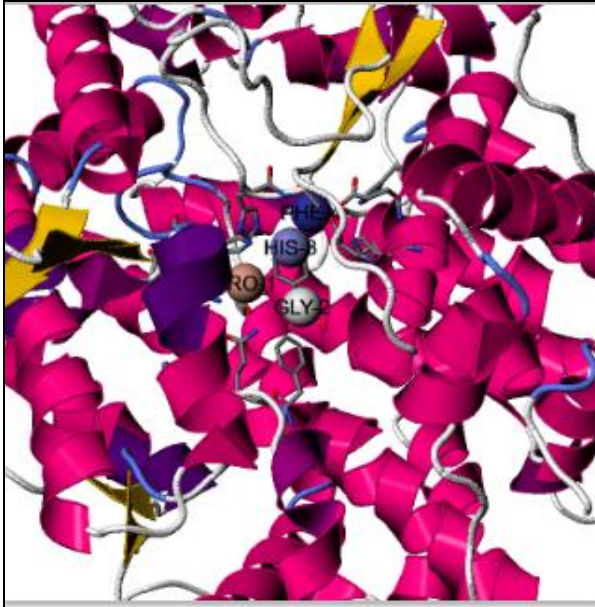
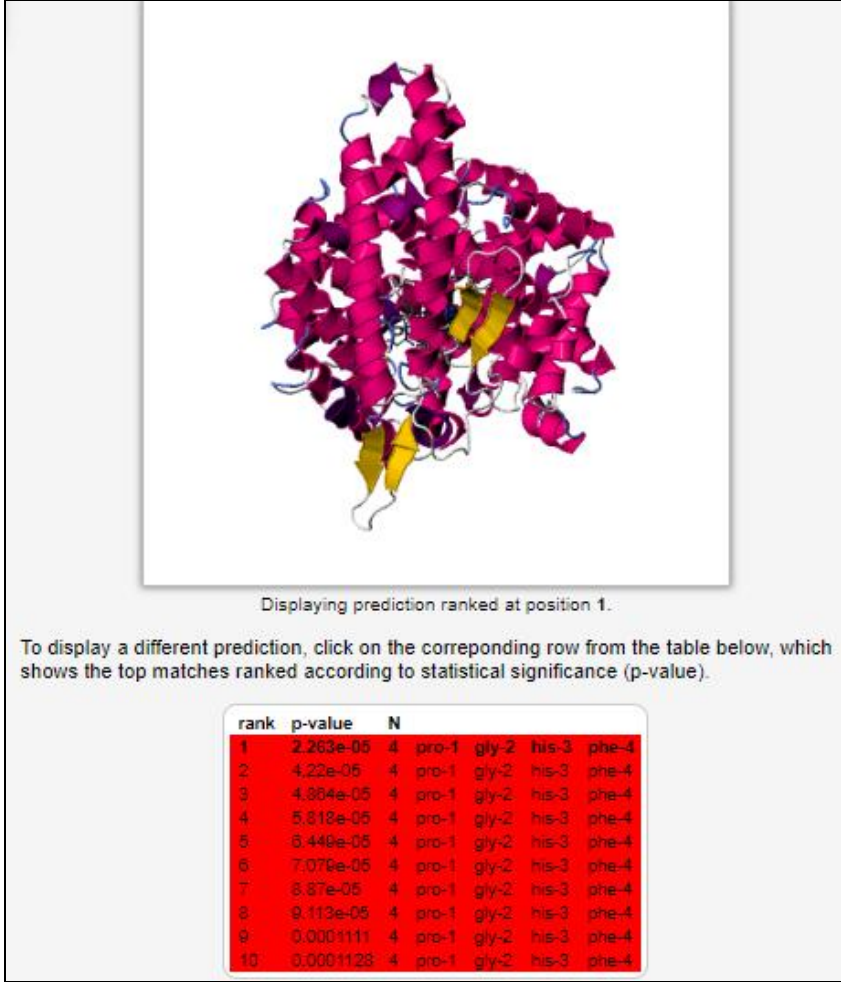


Şekil 26. Triptik peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan SPLAGR peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Üstte enzim ve inhibitör birlikte

gösterilirken, alttaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.



Şekil 27. Kimotriptik peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan VPHW peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Üstte enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, alttaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.



Şekil 28. Termolisin muamelesi ile hazırlanan peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan PGHF peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Üstte enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, alttaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

En muhtemel model, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç ortaya çıkarmaktadır. ACE'nin toplamda 1306 amino asit uzunluğuna sahip olduğu bilgisi modelin etkinliğinin anlaşılması açısından önemlidir. Diğer modeller bu model kadar etkin değildir ve genellikle istatistiksel olarak geçerli bir bağlanma ya da etkileşim tanımlayamamaktadırlar. Dolayısıyla, muhtemel bağlanma aşağıdaki tablolarda sunulan detaylara uygun bir biçimde gerçekleşmektedir.

Tablo 6. SPLAGR peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Sekans	Aktif amino asitler	p-değeri	ACE üzerinde bağlanılan amino asitler	
SPLAGR	Pro-2 Ala-4 Arg-6	Leu-3 Gly-5	0,0001473	Trp279, Gln281, His353, Ala354, His383, Glu384, Glu 411, Asp415, Phe457, Phe460, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523, Ser526, Phe527

En muhtemel modele göre 6 amino asitten oluşan SPLAGR triptik peptidi, ACE üzerinde 16 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir ve bu sayede inhibisyona sebep olabilmektedir.

Tablo 7. VPHW peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Sekans	Aktif amino asitler	p-değeri	ACE üzerinde bağlanılan amino asitler	
VPHW	Val-1 3 Trp-4	Pro-2 His-3	3,959E-05	Gln281, His353, Ala354, His383, Glu 411, Asp415, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523

En muhtemel modele göre 4 amino asitten oluşan VPHW kimotriptik peptidi, ACE üzerinde 10 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir ve bu sayede inhibisyona sebep olabilmektedir. Önceki tablo ile karşılaştırdığımızda bağlantı noktaları benzer olmakla birlikte bu peptidin daha az amino asit ile etkileştiği anlaşılmaktadır.

Tablo 8. PGHF peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Sekans	Aktif amino asitler	p-değeri	ACE üzerinde bağlanılan amino asitler	
PGHF	Pro-1 3 Phe-4	Gly-2 His-3	2,263E-05	Gln281, His353, His383, Glu384, His 387, Glu 411, Phe457, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523

En muhtemel modele göre termolisin ile hidroliz edilmiş, 4 amino asitten oluşan PGHF peptidi, ACE üzerinde 11 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir ve bu sayede inhibisyona sebep olabilmektedir. İlk tablodaki peptit (SPLAGR) ile karşılaştırdığımızda bağlantı noktaları benzer olmakla birlikte bu peptidin daha az amino asit ile etkileştiği anlaşılmaktadır. Öte yandan, ikinci peptit (VPHW) ile karşılaştırdığımızda peptitlerin uzunlukları eşit olmakla birlikte ACE üzerinde bağlanılan amino asit sayısı PGHF için daha yüksektir. Ancak her 3 durumda bağlanılan amino asitler genellikle benzerdir.

Aşağıdaki tabloda, pozitif kontrol olarak iyi bilinen bir ACE inhibitörü VPP ile bir kıyaslama yapılmaktadır.

Bu durumda VPP peptidinin bağlanabileceği 14 farklı amino asit belirlenmiştir. Bu bağlantı noktalarından 11 tanesi mevcut 3 peptit ile ortaktır. Öte yandan, koyu renkle gösterilen üç amino bağlantısı (His387, His410 ve Ala 412) VPP tripeptidine spesifiktir.

Tablo 9. Mevcut peptitlerin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi ve bu listelerin VPP peptidine ait liste ile kıyaslanması.

Sekans	Aktif amino asitler	p-değeri	ACE üzerinde bağlanılan amino asitler
SPLAGR	Pro-2 Leu-3 Ala-4 Gly-5 Arg-6	0,0001473	Trp279, Gln281, His353, Ala354, His383, Glu384, Glu411, Asp415, Phe457, Phe460, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523, Ser526, Phe527
VPHW	Val-1 Pro-2 His-3 Trp-4	3,959E-05	Gln281, His353, Ala354, His383, Glu411, Asp415, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523
PGHF	Pro-1 Gly-2 His-3 Phe-4	2,263E-05	Gln281, His353, His383, Glu384, His387, Glu411, Phe457, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523
VPP		2.951E-06	Gln281, His353, His383, His387, His410, Glu411, Ala412, Asp415, Phe457, His513, Tyr520, Tyr523, Ser526, Phe527

4.1.3 ACE-önleyici aktivite çalışmalarına ait sonuçların değerlendirilmesi

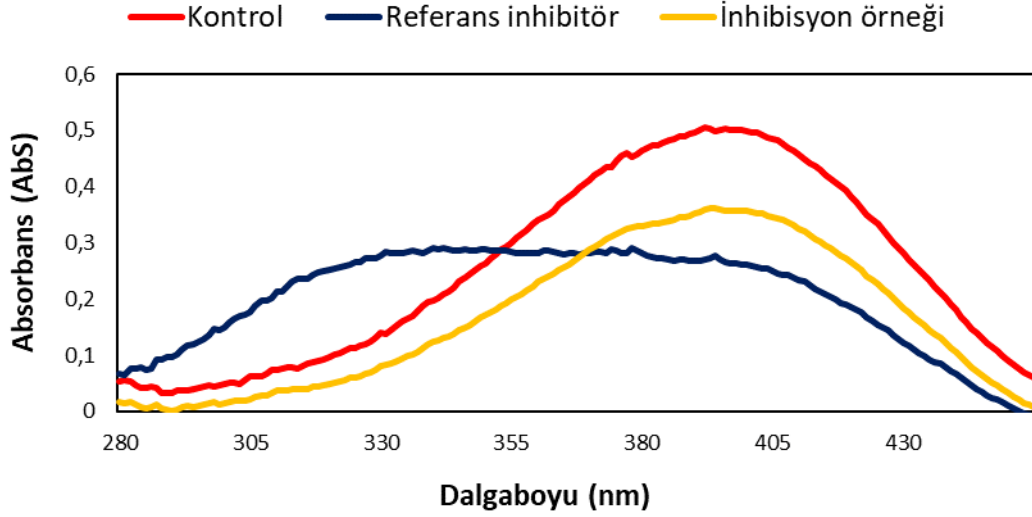
Basit sulu ekstraksiyon tekniklerine dayalı olarak, fındık proteini izolatları endüstriyel ortamlara kadar ölçeklendirilebilecek bir şekilde üretilebilme potansiyeli taşımaktadır. Güncel araştırmalar, fındık proteini hidrolizatlarının iyi tolere edilebileceğini, potansiyel olarak toksik ve kanserojen olmadığını öngörmüştür. Burada, çeşitli aktif (yani ACE-

inhibe edici) fraksiyonlar için 179 farklı peptidin özelliklerine ek olarak, bunların insan ACE ile potansiyel etkileşimleri de tartışılmıştır. Burada tanımlanan peptidler, Asya fıncığından üretilen peptidlerle aynı değildir (Liu vd. 2019a, b). Tüm bu bulgulara dayanarak, fıncık posaları, ACE inhibe edici peptitler için yeni ve değerli bir kaynak olarak düşünülebilir.

Biyoaktif peptitlerin saflaştırılması yüksek aktiviteye sahip ürünler oluştursa da, burada enzimatik hidrolizatlardaki çoklu fraksiyonların ACE-inhibe edici özelliklere sahip olduğunu etkili bir şekilde gösterdik. Fonksiyonel gıdalar, gıda takviyeleri ve kozmetikler gibi ticari uygulamalardaki üretim maliyetleri açısından, daha az saflaştırılmış fraksiyonların veya bazı durumlarda toplam hidrolizatın kullanılma olasılığının daha yüksek olduğunu düşünüyoruz. Hâlihazırda tanımlanmış peptitlerin sentezi ve yeniden değerlendirilmesi üzerine daha fazla çalışma yapılması tartışmasız gerekli olsa da, fıncık peptitlerinin MS tabanlı tanımlanması, fonksiyonel gıdalarda, gıda takviyelerinde ve farmasötik formülasyonlarda kullanılacak fonksiyonel ajanların tasarımına giden yolu açabilir.

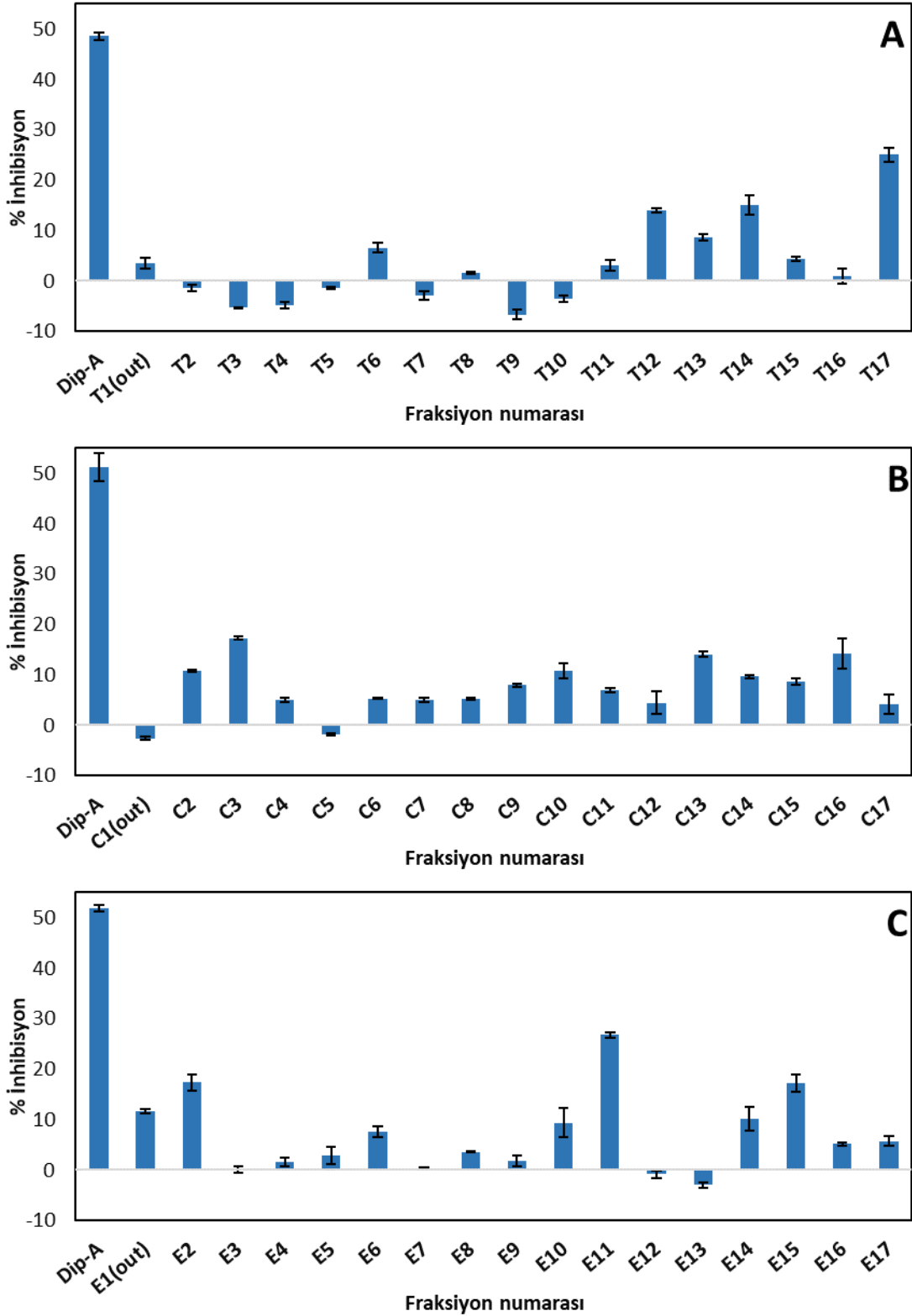
4.1.4. DPP-IV-önleyici aktivite

Bu çalışmada fıncık proteinlerinin antidiyabetik özelliğini belirlemek amacıyla yapılan DPP-IV önleyici aktivite testi için 5 ml yatak hacimli Capto-Q kolonunda 100 mM Tris-HCl pH:8 tamponu kullanılarak elde edilen fraksiyonlar kullanılmıştır. Tripsin, kimotripsin ve termolisin hidrolizatlarının anyon değişimi bazlı fraksiyonlanmasının ardından fraksiyonların DPP-IV önleyici aktivitelerini belirlemek için Nongonierma vd. (2018) tarafından tarif edilen analiz yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Referans inhibitör olarak Diprotin-A (dip-A) kullanılmıştır. DPP-IV enziminin Gly-Pro-pNA substratını parçalaması ile açığa çıkan pNA miktarı 405 nm dalga boyunda Shimadzu® BioSpec NanoDrop spektrofotometresi (Shimadzu, ABD) ile ölçülmüştür. Kontrol örneğinin maksimum pNA konsantrasyonuna sahip olduğu varsayılarak fraksiyon örnekleriyle karşılaştırılmıştır (Şekil 29). Fraksiyonların %DPP-IV aktiviteleri Şekil 30 üzerinde verilmiştir.



Şekil 29. DPP-IV inhibisyonu karşılaştırması için örnek spektrum. Karşılaştırma için 405 nm'de absorbans değerleri esas alınmıştır. Referans inhibitör olarak Diprotin-A kullanılmıştır.

Her bir hidrolizat örneğinden alınan fraksiyonların DPP-IV inhibisyon aktiviteleri Şekil 30 üzerinde sunulmaktadır. Tripsin hidrolizat fraksiyonlarında inhibisyon gösteren örnekler genellikle T10-T17 aralığındaki güçlü anyonik bileşikleri içeren fraksiyonlarda gözlemlenmiştir (Şekil 30A). Bu fraksiyonlar arasında en yüksek DPP-IV inhibisyon aktivitesi gösteren % 25,06±2 ile T17 fraksiyonu olmuştur. Kimotripsin hidrolizat fraksiyonlarında, kolona bağlanmayan bileşikleri içeren C1 (out) fraksiyonu ve C5 fraksiyonu hariç tüm fraksiyonlarda aktivite gözlemlenmiştir (Şekil 26B). Bu fraksiyonlar arasından % 17,25±1,2 inhibisyon oranı ile zayıf anyonik bileşikleri içeren C3 fraksiyonu en yüksek DPP-IV inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Termolisin hidrolizat fraksiyonlarında en yüksek DPP-IV inhibisyon aktivitesi gösteren % 26,82±0,8 ile E11 fraksiyonu olmuştur. Ayrıca E11 tüm hidrolizatlar arasında en yüksek aktiviteyi gösteren fraksiyon olmuştur. Elde edilen sonuçlar, Gülseren (2018) tarafından yapılan *in silico* değerlendirmesiyle uyumludur. Gülseren (2018) tarafından yapılan çalışmada fındık (*Corylus avellana* L.) peptitlerinin biyolojik fonksiyonelliğini değerlendirmek için 23 ribozomal protein üzerinde *in silico* çalışma yapılmıştır. Biyoaktif peptitlerin üretiminde, termolisin, papain ve bromelain proteazlarının gastrointestinal proteazlara (tripsin, pepsin, kimotripsin) kıyasla çoğu durumda daha etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Lacroix ve Li-Chan (2012b) tarafından yapılan çalışmada sodyum kazeinat ve whey proteinlerinin 11 farklı proteaz kullanılarak üretilen hidrolizatlarında DPP-IV inhibisyon aktivitesi incelenmiştir. Bu iki protein için en yüksek aktiviteyi termolisin hidrolizatları göstermiştir (sırasıyla %50 ve %51). Bu durum termolisin proteazının, DPP-IV inhibe edici biyoaktif peptitlerin üretilmesinde önemli bir katkısı olduğunu göstermektedir.



Şekil 30. Hidrolizat fraksiyonlarının % DPP-IV inhibisyonu (X: fraksiyon numarası, Y: %inhibisyon) (A) Tripsin hidrolizat fraksiyonları (B) Kimotripsin hidrolizat fraksiyonları (C) Termolisin hidrolizat fraksiyonları (Dip-A: referans inhibitör)

4.1.5 DPP-IV aktif fraksiyonların LC-MS/MS analizi ve *in silico* yöntemlerle değerlendirilmesi

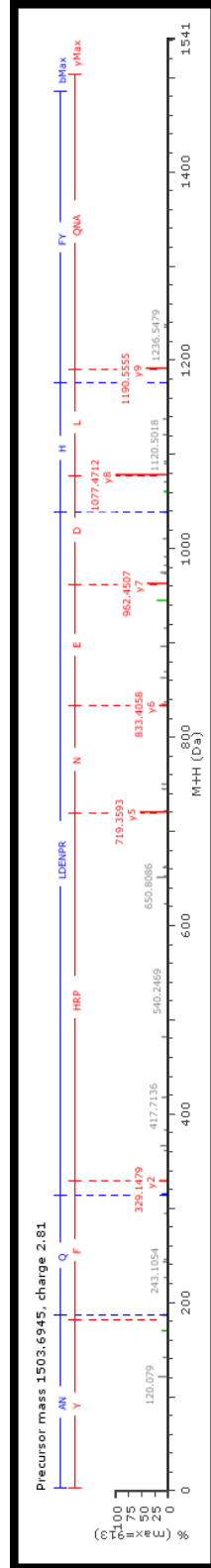
Çalıştığımız fındık proteinlerinden elde edilen enzimatik hidrolizatların fraksiyonlarını aldıktan sonra peptit yapılarını aydınlatmak için LC-Q-TOF-MS sisteminde analizler tamamlanmıştır. Analiz edilen peptit moleküllerinin Uniprot, PLGS, vb. veri bankalarındaki proteinlerle eşleştirerek peptit moleküllerinin yapıları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ancak bazı peptit moleküllerinin yapıları bu yolla belirlenememiştir. Bu durumun nedeni, protein veri tabanlarında bulunmayan (muhtemelen, yeni) proteinlerle karşılaşmış olmamızdır. Bu proteinlerin yapılarının aydınlatılabilmesi için, mevcut bütçe ve altyapımızın yetersiz kaldığı “de novo sekanslama” işlemlerine ihtiyaç bulunmaktadır. Sonraki çalışmalarda bu problemin de üstesinden gelinmesi planlanmaktadır.

Öncelikle literatürde (örneğin, UniProt veri tabanı), fındık ile ilgili 400'den fazla protein ve enzimatik proteolizden sonra, muhtemelen çeşitli boyutlarda ve aktivite potansiyellerinde oluşan binlerce farklı peptit vardır. Burada, tüm iyonlaşan peptitlerin yapılarını netleştirmek için bir girişimde bulunulmuştur. Dolayısıyla bazı peptitlerin (aktif veya inaktif) karakterizasyonu mümkün olmamıştır.

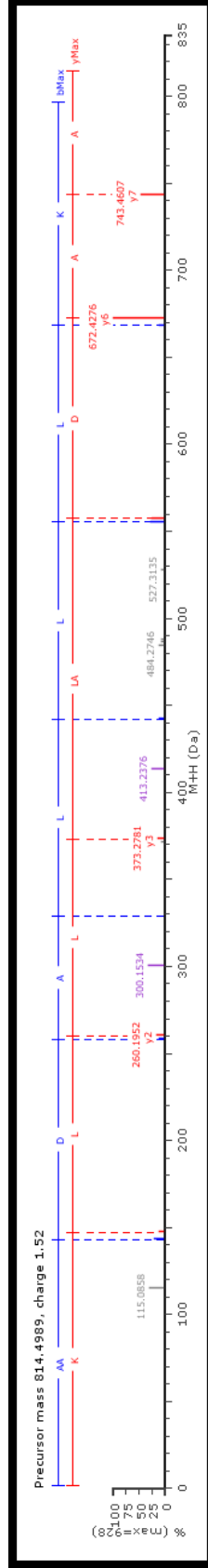
Önceki bölümlerde (tripsin, kimotripsin ve termolisin muameleleri) tarif edildiği üzere DPP-IV aktivitesi gösteren fraksiyonlar toplanarak uygun LC-MS/MS analiz teknikleriyle incelenmiştir. Bu bağlamda elde edilen bazı örnek spektrumlar aşağıda sunulmaktadır (Şekil 31-32). Çözülebilmiş olan peptit fraksiyonlarına ait 14 farklı peptit söz konusudur. Bu peptitler C10 ya da T12 fraksiyonlarında bulunmuştur.

Değerlendirmeler sonucunda, aktif fraksiyonlarının tamamına yakınında hem aktif hem de aktif olmayan peptitlerin bulunduğu anlaşılmıştır. Mooney vd. (2012) referansına göre (PeptideRanker) peptitlerin muhtemel biyoaktiviteleri sıralanmıştır. Bunun yanında, Minkiewicz vd. (2008) referansına göre, peptitlerin (eğer varsa) DPP-IV inhibisyon potansiyelleri incelenmiştir. 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, bazı out olmayan fraksiyonlarda bazik peptitler bulunmuştur.

DPP-IV aktif fraksiyonlara ait sinyallerin çoğunluğu veri tabanlarında olan proteinlerle eşleşmemiştir. Dolayısıyla bulgularımızın bir kısmı yeni protein ve peptit ürünlerine işaret etmektedir.



Şekil 31. C10 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum ANQLDENPRHFY peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.



Şekil 32. C10 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum ANQLDENPRHFY peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.

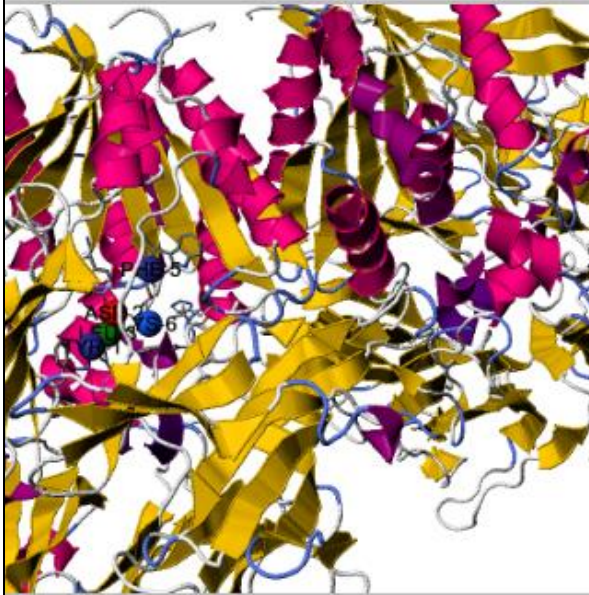
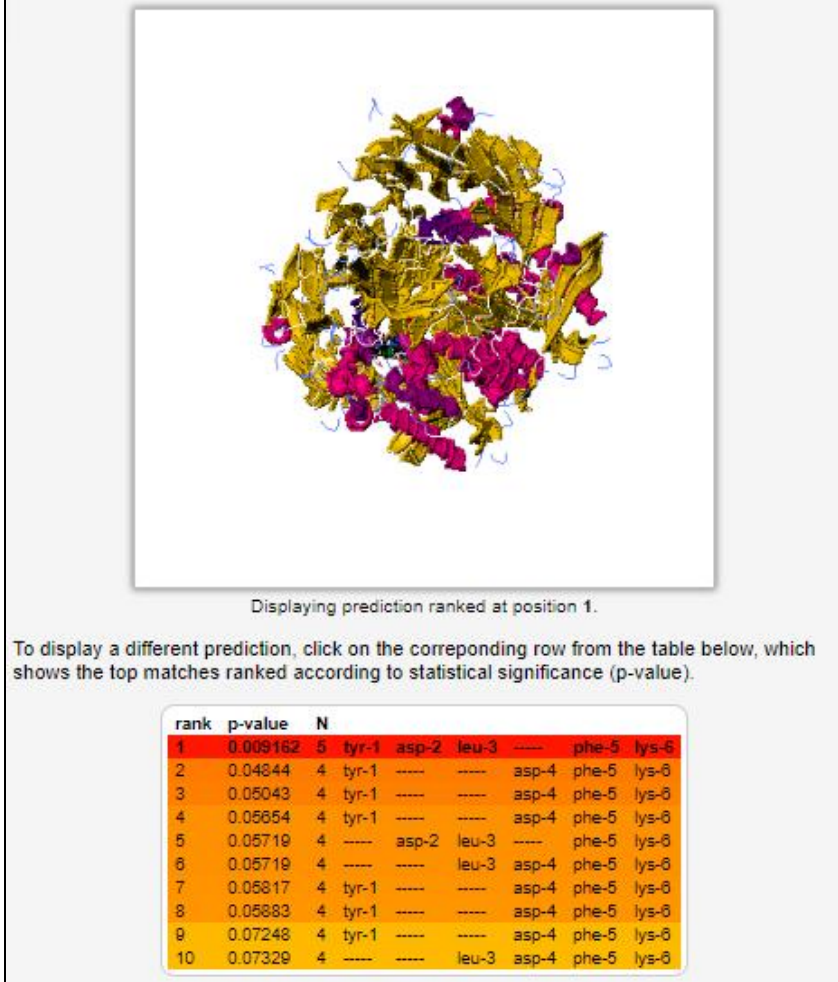
Hem *in vitro* DPP-IV aktivitesi bulgularan, hem de bu aktiviteleri *in silico* tekniklerce doğrulanan peptitlerden; DPP-IV inhibisyon parametreleri bulunanlar arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan YDLDFK peptidi seçilmiş ve inhibisyon mekanizması incelenmiştir (Trabuco vd. 2012). Bu bağlamda aşağıdaki Şekil 33 ve Tablo 10'da söz konusu inhibitör peptitin analizi sunulmaktadır.

En muhtemel model, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç ortaya çıkarmaktadır. DPP-IV enziminin toplamda 766 amino asit uzunluğa sahip olması, modelin etkinliğini göstermek için önemlidir. Diğer modeller bu model kadar etkin değildir ve genellikle istatistiksel olarak geçerli bir bağlanma ya da etkileşim tanımlayamamaktadırlar. Dolayısıyla, muhtemel bağlanma Tablo 10'da sunulan detaylara uygun bir biçimde gerçekleşmektedir.

Tablo 10. YDLDFK peptitinin DPP-IV ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Sekans	Aktif amino asitler	p-değeri	DPP-IV üzerinde bağlanılan amino asitler	
YDLDFK	Tyr-1 Leu-3 Lys-6	Asp-2 Phe-5	0,009162	Phe-357 Tyr-547 Trp-629 Ser-630 Val-656 Tyr-662 Tyr-666 Asn-710 Val-711 His-740

En muhtemel modele göre 6 amino asitten oluşan YDLDFK triptik peptiti, DPP-IV üzerinde 10 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir ve bu sayede inhibisyona sebep olabilmektedir.



Şekil 33. DPP-IV inhibisyon parametreleri bulunan DPP-IV inhibitörü peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan YDLDFK peptitinin, DPP-IV ile etkileşiminin şematize edilmesi. Solda enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, sağdaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

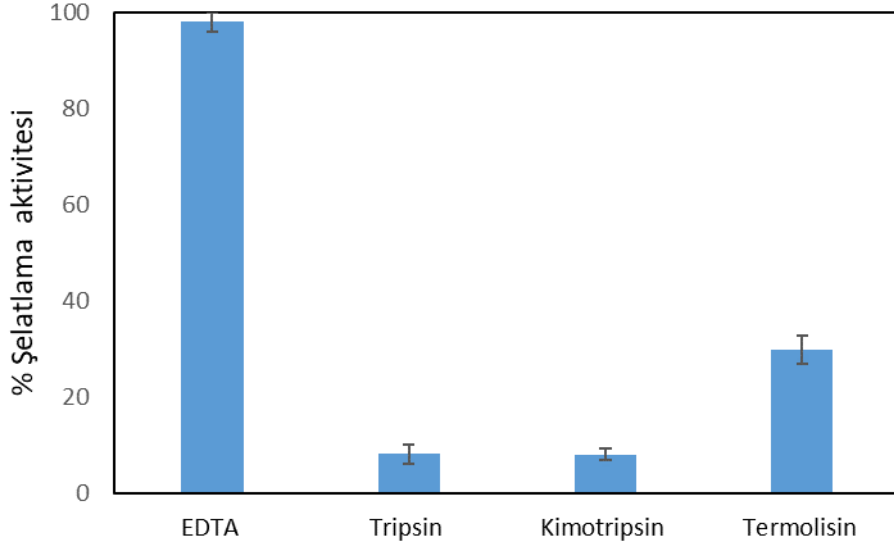
4.1.6. Antioksidatif aktivite testleri

Antioksidatif aktivite testleri için 5 ml yatak hacimli Capto-Q kolonunda 20 mM Tris-HCl pH:8.3 tamponu kullanılarak elde edilen fraksiyonlar kullanılmıştır.

4.1.6.1 Demir şelasyon aktivitesi

Protein hidrolizatlarının, Fe^{+2} iyonlarını şelatlama kapasitesi Dinis vd. (1994) yöntemine uygun olarak belirlenmiştir. Fe^{2+} -ferrozin kompleksinin oluşturduğu magenta renk 562 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Antioksidatif peptitlerin demir iyonlarını bağlaması, magenta rengin ve absorbans değerinin giderek azalmasına neden olur. Tampon çözeltilerin analiz sonuçlarını engellemesi sebebiyle bu test için tampon çözelti kullanılmadan proteinler hidroliz edilmiş ve fraksiyonlama işlemi yapılmadan doğrudan hidrolizat örnekleri kullanılmıştır. Kontrol örneği olarak hidrolizat örneğinin yerine deiyonize su kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak EDTA kullanılmıştır. Demir şelasyon aktivitesi, hidrolizat örneklerinin absorbans değerleri kontrol örneği ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Örneklerin % şelatlanma kapasiteleri Şekil 34 üzerinde verilmiştir.

Şekil 34'de %1 konsantrasyona sahip protein hidrolizatlarının Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesi karşılaştırıldığında yaklaşık 30 ± 2 ile en yüksek aktiviteyi termolisin hidrolizatı göstermiştir. Tripsin ve kimotripsin hidrolizatları yaklaşık %8 ile benzer şelatlama aktivitesi göstermişlerdir. EDTA çalışılan en düşük konsantrasyonu 100 $\mu\text{g/ml}$ 'de dahi 98 ± 2 şelatlama aktivitesi göstermiştir. Torres-Fuentes vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada nohut proteinlerinde sindirim enzimleri kullanılarak elde edilen hidrolizatlarda demir şelasyon aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmada hidrolizatlar yaklaşık %10 aktivite göstermiş ve pozitif kontrol EDTA 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda 99 ± 1 aktivite göstermiştir. Bu bağlamda elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur.



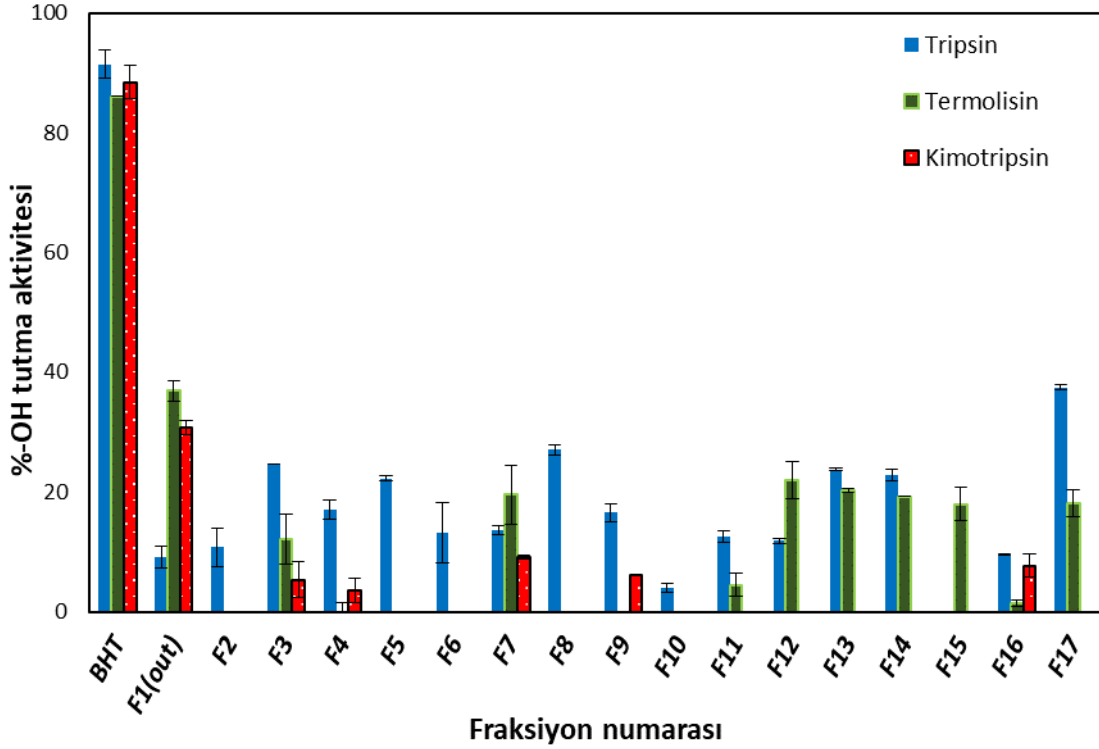
Şekil 34. Çeşitli proteazlar tarafından hidrolize edilmiş fındık hidrolizatlarının % şelatlanma kapasitesi. Hidrolizatlar %1 protein içerecek şekilde saf su içerisinde pH 8'e ayarlanarak hazırlanmış ve tripsin, kimotripsin ve termolisin proteazları kullanılmıştır. EDTA (100 µg/ml) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

4.1.6.2 Hidroksil radikali tutma aktivitesi

Hidroksil radikali düşük pH değerlerinde tiyobarbitürik asit ile ısıtıldıktan sonra pembe bir kromojen veren ürünler oluşturmak üzere deoksiriboz ile tepkimeye girer. Eklenen hidroksil radikal tutucu bileşikler (örneğin, antioksidatif peptitler) üretilen hidroksil radikalleri için deoksiriboz ile rekabet eder ve kromojen oluşumunu azaltır (Halliwell vd.1987). Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi Halliwell vd. (1987) tarafından gerçekleştirilen yöntem uygun olarak yapılmıştır. BHT (0,03 mg/ml), bu deneyde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Fraksiyonlar alınma sıralarına göre numaralandırılarak numunelerin hidroksil radikali tutma aktiviteleri Şekil 35 üzerinde ortak olarak gösterilmiştir.

Fraksiyonların hidroksil radikali tutma aktivitesi karşılaştırıldığında tripsin hidrolizatından elde edilen F17 fraksiyonu % 37,48±0,7'lik bir oranla en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Bu oranı % 36,9±1,7 ile termolisin F1 ve % 30,7±1,3 ile kimotripsin F1 fraksiyonları takip etmiştir. Pozitif kontrol 0,136 mM BHT % 88,4±2 aralığında aktivite göstermiştir. Fraksiyonların bir kısmında aktivite gözlemlenmez iken birçok fraksiyondan düşük aktivite değerleri elde edilmiştir. Toplamda elde edilen 51 fraksiyondan 31 tanesinde aktivite gözlenmiş ve bunların içinden sadece 10 tanesi %20 üzerinde aktivite göstermiştir. Fraksiyonlamanın kısa aralıklarla yapılmasına bağlı olarak bazı ardışık fraksiyonların kompozisyonlarının benzer içeriğe sahip olabileceği ve güçlü anyonik

fraksiyonların demir şelatlamaya bağlı olarak aktivite göstermiş olabileceği düşünülmektedir. Referansın etkinliği bütün fraksiyonlardan daha yüksek bulunmuştur.



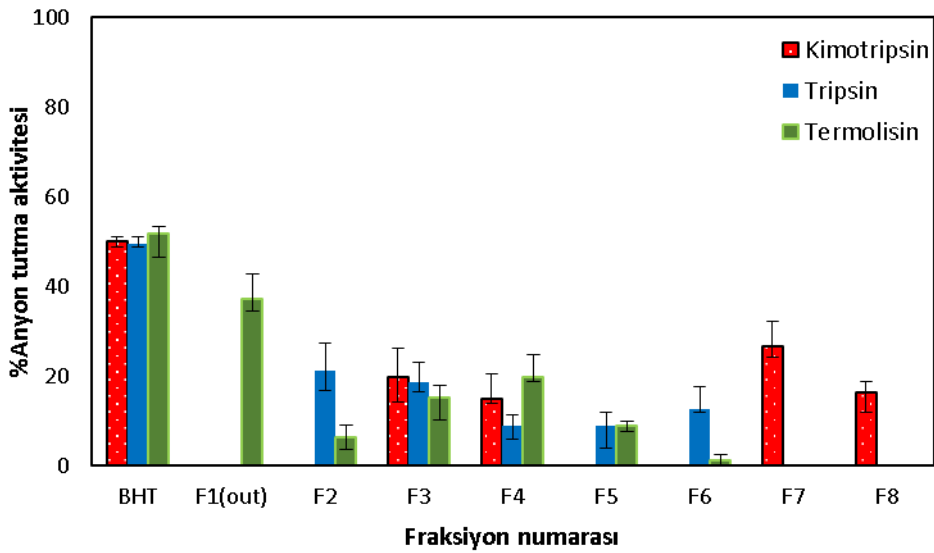
Şekil 35. Çeşitli proteazlar tarafından hidroliz edilmiş fındık peptit fraksiyonlarının hidroksil radikali tutma aktivitesi. Örnekler Capto-Q 5 ml yatak hacimli kolonda 20mM Tris-HCl (pH 8,3) tamponu kullanılarak 2 CV aralıklarla fraksiyonlanmış ve 17 fraksiyon toplanmıştır (F1-F17). BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

4.1.6.3 Süperoksit anyon tutma aktivitesi

Pirogallol sulu çözeltide hızla otoksidize olan bir reaktiftir. Çözeltide ilk önce 400 - 425 nm arasında maksimum absorbans gösteren sarı-kahverengi rengi oluşturmaktadır. Oda sıcaklığında saklama esnasında birkaç dakika sonra renk yeşile dönmeye başlar ve son olarak, birkaç saat sonra sarı bir renk görünür. Absorbans değerindeki artış ile oksijen tüketimi arasında sabit bir ilişki bulunmaktadır (Marklund ve Marklund,1974). Bu çalışmada Marklund ve Marklund (1974) tarafından yayınlanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. BHT (0,03 mg/ml), bu deneyde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Süperoksit anyon tutma aktivitesi gösteren fraksiyonlar Şekil 36 üzerinde ortak olarak gösterilmiştir.

Süperoksit anyon tutma aktivitesi testinde değerlendirilen hidrolizat örnekleri arasında F9-F17 aralığındaki fraksiyonlarda aktivite gözlemlenmemiştir. Bu durumun F9-F17 aralığındaki fraksiyonlarda güçlü anyonik özellik gösteren bileşiklerin varlığından

kaynaklandığı düşünülmektedir. Süperoksit anyon tutma aktivitesi gösteren fraksiyonlar karşılaştırıldığında termolisin hidrolizatından elde edilen F1(out) fraksiyonu $37,4 \pm 3,7$ ile en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Bu oranı $26,7 \pm 3,8$ ile kimotripsin F7 fraksiyonu takip etmiştir. Pozitif kontrol BHT ($0,03 \text{ mg/ml}$) ise $50,5 \pm 1,5$ oranında aktivite göstermiştir. Oktay vd. (2003) tarafından yapılan çalışmada BHA ve BHT'nin süperoksit anyon radikali tutma IC_{50} değerlerinin sırasıyla 0.031 ve 0.061 mg/ml olduğunu bildirmiştir. Bu değerlere göre BHT'nin aktivitesi Oktay vd. (2003) tarafından yapılan çalışmaya kıyasla iki kat fazla bulunmuştur. Bu durum kullanılan kimyasallar, inkübasyon süresi, pH, ortam sıcaklığı gibi birçok metot farklılıklarından kaynaklanabilmektedir. Bu bağlamda sonuçların literatüre uygunluğu net bir biçimde kıyaslanamamıştır.



Şekil 36. Çeşitli proteazlar tarafından hidroliz edilmiş fındık peptit fraksiyonlarının süperoksit anyon tutma aktivitesi. Örnekler Capto-Q 5 ml yatak hacimli kolonda 20 mM Tris-HCl (pH 8,3) tamponu kullanılarak 2 CV aralıklarla fraksiyonlanmış ve 17 fraksiyon toplanmıştır (F1-F17). BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Fındık protein konsantrelerinden termolisin, kimotripsin, tripsin proteazları kullanılarak elde edilen hidrolizatlar ve fraksiyonlarda yapılan antioksidan aktivite testlerinde genel olarak düşük aktiviteler gözlemlenmiştir. En yüksek antioksidan aktivite hidroksil radikali tutma testinde $37,48 \pm 0,7$ ile tripsin F17 ve $36,9 \pm 1,7$ ile termolisin F1(out) fraksiyonlarında gözlemlenmiştir. Ancak güçlü anyonik bileşikler içeren tripsin F17 fraksiyonunun metal şelatlayıcı özellik göstererek Fe^{+2} 'nin aktivitesini değiştirmiş olabileceği ve bu sebeple yüksek aktivite gösterdiği düşünülmektedir. Sonuçların bazik pH değerlerinde anyon değişim kromatografisi kullanılarak ve uzun elüsyon (32 CV) çalışmalarında kısa aralıklarla fraksiyonlanan (2 CV) anyonik peptitlerden elde edildiği göz önünde bulundurulmalıdır. Fraksiyonlamanın kısa aralıklarla yapılmasına bağlı olarak bazı ardışık fraksiyonların kompozisyonlarının benzer içeriğe sahip olabileceği ve



ayrıca güçlü anyonik bileşikleri içeren fraksiyonların metal şelatlayıcı olarak antioksidan aktivite göstermiş olabileceği düşünülmektedir. LC-MS/MS analizi sonuçlarına göre özellikle C2 ve C3 fraksiyonları (kimotripsin F2 ve F3) 1 peptit haricinde aynı peptit içeriğine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu durum LC-MS/MS analizi yapılmayan fraksiyonlarda da benzer durumların olabileceğini göstermektedir. Gülseren (2018) tarafından fındık (*Corylus avellana* L.) peptitleri üzerine yapılan *in silico* çalışmada, antioksidan aktivitenin bir dereceye kadar gözlemlenebileceği ve diğer biyoaktivitelere (örneğin, ACE-önleyici ve DPP-4 önleyici aktivitelere) kıyasla daha az sıklıkta olduğu tahmin edilmiştir. 179 proteolitik senaryo içerisinde sadece 44 vakada antioksidan aktivite öngörülmüştür (yaklaşık %25). Bu bağlamda yapılan *in vitro* çalışma *in silico* tahminleriyle paralellik göstermektedir.

4.2 Çörek otu proteinlerinin tripsin ve papain muameleleri ile ilgili çalışmalar

Bu kısımda yapılan çalışmaları içeren bir makaleye “Journal of Food Measurement and Characterization” dergisine gönderilmiş, 14/09/2020 tarihinde kabul edilmiştir. Bu makale, EK-3 kapsamında bilgilerinize sunulmaktadır.

Çalışmamız kapsamında soğuk preslenmiş çörek otu yan ürünlerinden; protein konsantreleri ve bu protein konsantrelerinin papain ve tripsin enzimleri kullanılarak farklı sürelerde (0, 15, 30, 60, 90 ve 120 dakika) hidroliz edilmesiyle çörek otu protein hidrolizatları elde edilmiştir. Ekibimizin önceki çalışmalarında yağı alınmış çörek otu posalarından alkali ekstraksiyon-izoelektrik çöktürme yöntemi ile elde edilmiş protein konsantrelerinin protein miktarı Kjeldahl analizi ile 54.7 ± 0.5 olarak belirlenmiştir (Çakır ve Güseren, 2019). Elde edilen konsantre ve hidrolizatlara çeşitli anti-oksidatif testler (DPPH inhibisyonu, demir şelasyon aktivitesi ve hidroksil radikali tutma aktivitesi) ve asetilkolinesteraz (AChE) inhibe edici anti-Alzheimer biyoaktif testi uygulanarak protein konsantrelerinin ve hidrolizatların özellikleri araştırılmıştır. Papain ve tripsin enzimi olmak üzere iki ayrı enzim kullanılarak farklı sürelerde bu enzimlerin hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatların antioksidatif ve biyoaktif özellikleri belirlenmiştir. Papain ve tripsin enzimleri ile farklı sürelerde gerçekleştirilen muamele sonucu elde edilen hidrolizatlara ait sonuçlar Tablo 11’de özetlenmiştir. Detaylar sonraki bölümlerde verilmektedir.

Tablo 11. Papain ve tripsin enzimleri ile elde edilen hidrolizatlardan, antioksidatif testler ve asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyon testlerinde elde edilen en yüksek (%) inhibisyon sonuçlarını ortaya çıkaran koşullar.

Test	Hidroliz Süresi (dak.)	% İnhibisyon
AChE önleyici aktivite	30	25.63 \pm 0.6
DPPH tutma aktivitesi	120	59.80 \pm 2.6
Demir şelasyon aktivitesi	90	59.23 \pm 5.5
Hidroksil radikali tutma aktivitesi	15	60.51 \pm 2.0

Yapılan testler sonucu en yüksek aktivitenin görüldüğü hidrolizat örneği (papain enzimi ile 30 dakika hidroliz edilmiş çörek otu protein konsantresi) fraksiyonlanarak dört ayrı fraksiyon elde edilmiştir (PA, PB, PC, PD). Elde edilen bu fraksiyonlara tekrar DPPH tutma aktivitesi testi uygulanarak anti-oksidatif özelliği değerlendirilmiştir. Bununla beraber, LC MS/MS analizi ile fraksiyonlanmış dört adet protein hidrolizatlarının (PA, PB, PC ve PD) peptit yapıları aydınlatılmıştır.

Elde edilen protein ve peptitlerin, anti-Alzheimer etkilerinin incelenebilmesi için yapılan asetilkolinesteraz (AChE) önleyici aktivite testinin sonuçları aşağıda tartışılmıştır.

4.2.1 AChE önleyici aktivite testi

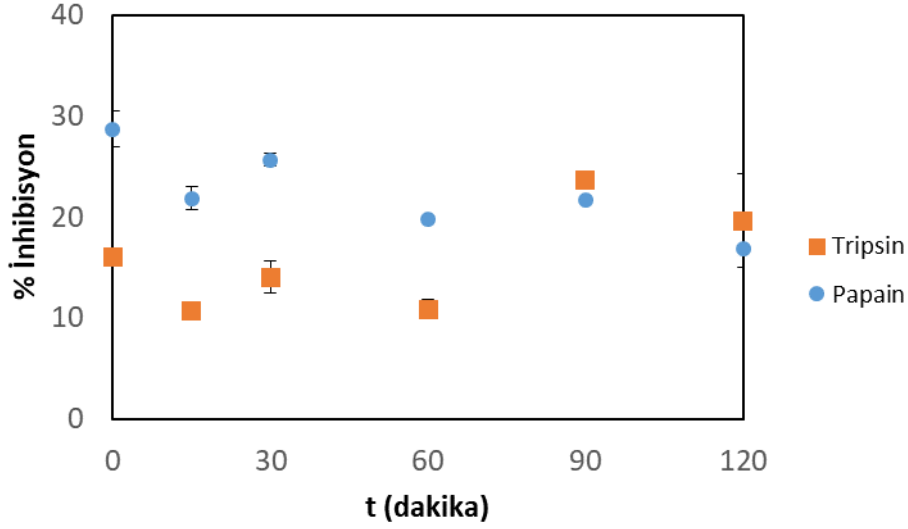
Asetilkolinestraz (AChE), bir nörotransmitter olan asetilkolini (ACh) asetik asit ve koline katalizleyen bir enzimdir (Koçancı ve Aslım, 2016). Alzheimer hastalığının gözlendiği beyin dokularının incelenmesi sonucu; AChE'nin etkinliğinin arttığı ve buna bağlı olarak sinir iletimini sağlayan AChE'nin miktar ve aktivasyonunun düştüğü belirlenmiştir. Sinir iletiminin kesintiye uğraması da bilişsel eksiklik ve davranışsal anormallikler ile karakterize nörolojik bir hastalık olan Alzheimer hastalığı (AH) ile sonuçlanmaktadır (Şenol vd., 2010). Bu nedenle AChE'yi kolin ve asetik aside hidrolizleyen kilit enzim olan asetilkolinesterazın (AChE) inhibisyonu, AH'ye karşı en yaygın kullanılan tedavi seçeneklerinden biri haline gelmiştir (Orhan, Orhan ve Şener, 2006). Karaciğerden salgılanan ve bir diğer kolinestraz olan bütirilkolinestraz (BChE) bütirilkolini katalizlemektedir. Bütirilkolinestrazın da kolin bileşiklerinin varlığını azaltmasından dolayı Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle BChE ile yapılan anti-Alzheimer çalışmaları da bulunmaktadır (Beach, 2000).

AH'nin tedavisinde kullanılan Amerikan İlaç Dairesi), ("Food and Drug Administration", FDA) onaylı asetilkolinesteraz inhibitörlerinden Rivastigmin (*Physostigma venenosum* Balf.) ve Galantamin (*Amaryllidaceae* alkaloidi) bitkisel kaynaklı, Takrinin ve Donepezil ise sentetik kaynaklı ilaçlardır. Bunlarla beraber zerdeçaldan (*Curcuma longa*) elde edilen kurkuminin de Alzheimer hastalığını önlediğine dair yapılan klinik çalışmalar devam etmektedir (Konakçı ve Aslım, 2016).

Çalışmamızda çörek otu protein konsantreleri ve papain ve tripsin enzimleriyle farklı süreler (15, 30, 60, 90 ve 120 dakika) boyunca muamele edilmiş hidrolizatlarla çörek otunun AChE önleyici aktivitesi araştırılmıştır ve sonuçlar Şekil 37'de verilmiştir.

Öncelikle, çörek otu protein konsantrelerinin hidroliz edilmeden önce (t=0) AChE önleyici aktiviteleri (% 28.72 ± 1.78 ve % 16.03 ± 0.08) gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle papain ile hidrolize edilmiş örneklerde hidrolize edilmemiş örneklere göre aktivitenin düştüğü, en yüksek aktivitenin % 28.72 ± 1.78 ile hidroliz edilmemiş (t=0) çörek otu protein konsantresine ait olduğu görülmektedir. Tripsin ile hidroliz edilmiş örneklerde, hidroliz edilmemiş protein konsantrelerine göre inhibisyonun daha düşük olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, 90. ve 120.dakikalarda sırasıyla % 23.68 ± 0.66 ve % 19.62 ± 4.66

oranlarıyla protein konsantrisine göre daha yüksek oranda inhibisyon değerleri elde edilmiştir.



Şekil 37. Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri AChE önleyici aktiviteleri.

Enzim aktivitelerini kendi aralarında kıyaslamak gerekirse; hidroliz edilmemiş konsantrilere göre papain hidrolizinin inhibisyonu düşürmüş olmasına rağmen tripsin ile hidroliz edilen örneklere göre daha yüksek inhibe edici etki gösterdiği söylenebilir. Bu durumda papain ile elde edilen hidrolizatların daha fazla muhtemel anti-Alzheimer etkisi gösteren hidrolizatlar olduğunu söylemek mümkündür. Bununla beraber hidroliz işlemi uygulamadan (t=0) en yüksek inhibisyon aktivitesinin görülmesi, çörek otu proteininin *in vitro* olarak doğrudan anti-Alzheimer etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Zaman ve enerji tasarrufu yönünden incelendiğinde de hidroliz işlemi olmadan istenen etkinin görülebilmesi oldukça önemlidir. Buna ek olarak, mevcut protein üretim tekniği de endüstriyel koşullara adapte edilmeye uygundur. Hidroliz işlemi uygulanmadan da çörek otu proteinlerinin biyoaktif etkiler gösterme potansiyeli taşıdığı anlaşılmaktadır.

Günümüzde, Alzheimer hastalığında kullanılan AChEi ilaçlar kesin başarı sağlayamadığından bu hastalığa karşı koruyucu ve tedavi edici potansiyele sahip yeni AChE inhibitörlerinin araştırılmasına yönelik çalışmaların oldukça önemli olduğu belirtilmektedir (Konakçı ve Aslım, 2016). Bu nedenle soğuk pres yağ sanayinin bir yan ürünü olan çörek otu posasından elde edilecek biyoaktif peptit ve proteinler önem kazanmaktadır. Bu bileşenlerin gıda, kozmetik ve eczacılık ürünlerinde kullanım potansiyeli, tüketimi nispeten zor bir ürün olan çörek otunun da kullanılabilirliğini arttırmaktadır.

4.2.2 Antioksidatif aktivite testleri

İnsan sağlığı açısından, kanser ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve birçok hastalığın görülme sıklığının azaltılmasında çeşitli kaynaklardan elde edilen antioksidanlar önemli bir rol oynamaktadır (Oroian ve Escriche, 2015). Bununla beraber gıda ürünlerinde gerçekleşen lipit oksidasyonunun inhibe edilmesinde protein ve peptitlerin etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Süt proteini, soya proteini, buğday proteini, pirinç proteini ve mısır proteini antioksidatif etkiler gösteren çeşitli kaynaklardandır (Singh, 2011).

Serbest radikallerin çok çeşitli olması ve çörek otu proteinlerinin bu serbest radikallerden hangilerine karşı anti-oksidatif etki gösterme potansiyeline sahip olduğunu belirlenmesi amacıyla birden fazla anti-oksidatif test uygulanması uygun görülmüştür.

Çörek otu protein ekstraktlarının papain ve tripsin enzimleriyle farklı süreler boyunca (0, 15, 30, 60, 90, 120 dakika) hidroliz edilmiş örneklere uygulanan; DPPH, demir şelasyon aktivitesi ve hidroksil radikali tutma aktivitesi testleri sonuçları ile beraber tartışılmıştır.

4.2.2.1 DPPH Tutma Aktivitesi Testi

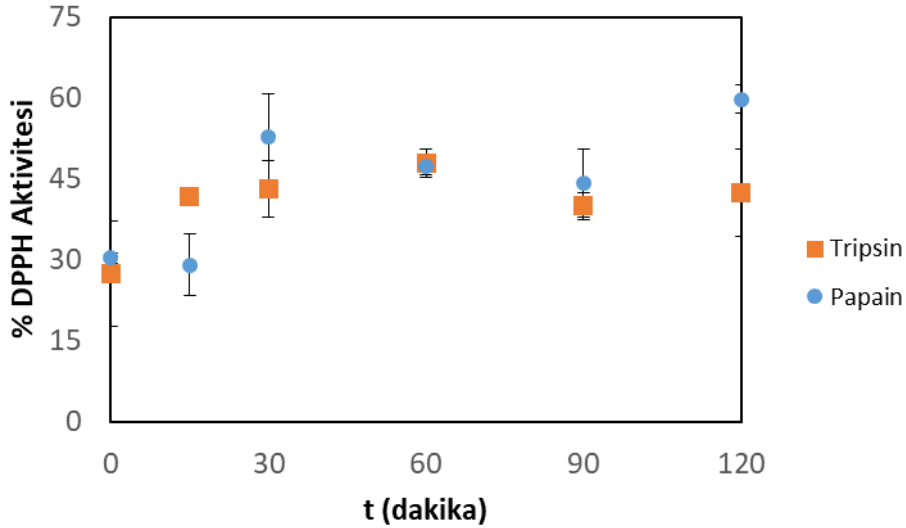
DPPH radikali; antioksidanların serbest radikal giderme aktivitesini ölçmek için kullanılan ilk sentetik radikaldir (Frankel ve Meyer, 2000). Etanol içindeki çözeltisi mor renkli olan DPPH radikali, antioksidan tarafından indirgendikçe rengi açılmaya başlar. Antioksidan konsantrasyonu ve renk açılması arasında doğrusal bir ilişki olan bu analizde reaksiyonun ilerleyişi spektrofotometre kullanılarak absorbans ölçümü ile gerçekleştirilmektedir (Frankel ve Meyer, 2000). Antioksidan aktivitesinin bulunmadığı ortamlarda renk değişikliği olmadığı için absorbans değerlerinde değişiklik gözlenmemektedir.

Singh (2011) tarafından proteinlerin, protein hidrolizatlarının ve fraksiyonlarının serbest radikalleri temizleme etkisinin ölçüldüğü yöntemlerden biri olarak belirtilen DPPH tutma aktivitesi testi, çalışmamızda kullanılmıştır. Bu çalışmada; hidroliz edilmemiş protein ekstraktı ve farklı süreler (15, 30, 60, 90, 120 dak.) boyunca papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz edilmiş konsantrelerin DPPH tutma aktivitesi testi ile antioksidan kapasiteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 38'de verilmiştir.

Papain enzimi kullanılarak hidroliz edilmiş çörek otu protein konsantrelerinde; hidroliz edilmemiş protein konsantresinin (0.dak.) DPPH radikali inhibe etme aktivitesi % 30.35

± 0.1 olarak bulunurken 15.dakika da bu aktivitede biraz azalma gözlenmiştir. 30. dakikada aktivite, 0. dakikaya göre artarken 60 ve 90. dakikalarda 30.dakikaya göre azalma görülmüştür. En yüksek aktivite ise $\% 59.80 \pm 2.6$ ile 120 dakika hidroliz edilmiş konsantreden elde edilmiştir. 30 dakika hidroliz edilmiş konsantrenin $\% 52.76 \pm 8$ ile 120 dakika hidroliz edilmiş konsantrenin aktivitesine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara dayanarak papain enzimi ile hidroliz sonucu; zaman ve enerjiden tasarruf etmek amacıyla 120 dakika yerine 30 dakika hidroliz ile çörek otu protein konsantresi hidrolizatlarından en etkili sonuçların alınabileceği söylenebilir.

Tripsin enzimi kullanılarak hidroliz edilmemiş protein konsantresinden (0.dak.) alınan $\% 27.42 \pm 9.7$ sonucu ve tripsin enzimi ile 15 dakika hidroliz edilmiş konsantreden $\% 41.71 \pm 0.4$ sonucunun alınması, hidroliz işleminin DPPH radikali giderme etkisini arttırdığını göstermektedir. 15, 30, 60, 90 ve 120 dakika hidroliz edilmiş konsantrelerde sonuçların birbirine yakın değerlerde olduğu görülmektedir. DPPH radikalini giderme aktivitesinin 60 dakika hidroliz edilmiş protein konsantrelerinde $\% 47.83 \pm 2.7$ ile en yüksek değerde olduğu belirlenmiştir. Hidroliz süresinin 60.dakikadan itibaren uzatılmasının ise 90.dakikada $\% 39.99 \pm 2.5$ ve 120. dakikada $\% 42.47 \pm 8.1$ sonuçlarının elde edilmesiyle antioksidatif etkiyi düşürdüğünü göstermektedir.



Şekil 38. Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri DPPH inhibisyonu.

Her iki enzimi birbiri ile kıyaslamak gerekirse; 15 dakikalık bir hidroliz ile tripsin enziminin en iyi sonucuna yaklaşılrken, papain enziminde 15 dakikalık hidroliz sonucu hidroliz edilmemiş konsantreye göre bir miktar düşüş gözlenmiştir. Papain enziminde görülen en yüksek serbest radikal giderme değerine ise 30 dakikalık hidroliz sonucu yaklaşıldığı

görülmüştür. Papain enzimi ile hidrolizde süresinin uzatılmasıyla aktivitenin de artabileceğini fakat tripsin enziminde sürenin çok kritik bir gelişmeyi açığa çıkarmadığını söylemek mümkündür. Her iki enzimin aynı süre içindeki sonuçlarında benzerlik olmakla beraber 120. dakikada papain enziminin etkisi % 59.80 ± 2.6 ile diğer sonuçlara göre daha yüksektir.

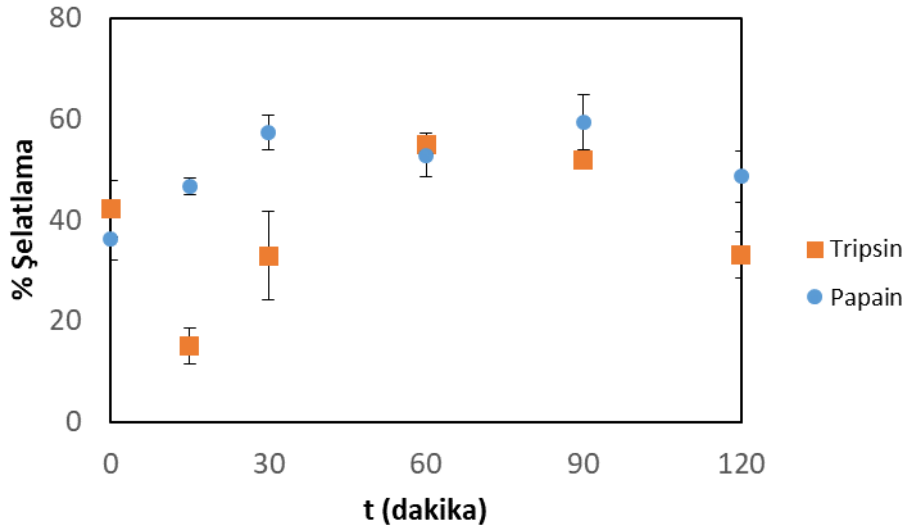
Sentetik bir radikal olan DPPH radikali kullanılarak çörek otu protein konsantresi ve farklı sürelerde (15, 30, 60, 90 ve 120 dakika) papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz edilmiş konsantrelerden elde edilen sonuçlara göre; çörek otu protein konsantrelerinin ve hidroliz edilmiş konsantrelerinin DPPH radikalini giderme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

4.2.2.2 Demir şelasyon aktivite testi

Demir şelasyon aktivitesi testi; güçlü bir demir bağlayıcı reaktif olan ferrozin ve analiz edilmek istenen örneğin (çalışmamızda çörek otu protein konsantreleri ve bunların hidrolizatları) Fe^{2+} iyonlarının olduğu ortamda birlikte bulunarak, iyonları bağlama yarışını göstermektedir (Dinis, Madeira ve Almeida, 1994). Fe^{2+} /ferrozin kompleksi güçlü kırmızı renk vermektedir ve bu kompleksin oluşması engellendikçe kırmızı renk oluşumu azalmaktadır. Dolayısıyla analiz spektrofotometrik bir ölçüme dayanmaktadır (Dinis, Madeira ve Almeida, 1994). Demir şelatörlerinin hücre içine girmesiyle serbest demiri bağlayarak etkisizleştirmeleri, hidroksil radikalinin oluşmasını engelleme açısından oldukça önemlidir. Elde edilen sonuçlar Şekil 39 üzerinde verilmiştir.

Çörek otu protein konsantrelerinin ve papain ve tripsin enzimleri kullanılarak farklı sürelerde (15, 30, 60, 90, 120 dakika) elde edilen hidrolizatlarının demir şelatlama aktivitesinin sonuçları Şekil 34 üzerinde detaylandırılmıştır. Papain ile hidroliz edilmemiş protein konsantresinin (0. dakika) % 36.19 ± 4.2 sonucu, farklı sürelerde (15, 30, 60, 90 ve 120 dakika) gerçekleştirilen hidroliz sonucu elde edilen sonuçlara göre daha düşüktür. Demir şelasyon aktivitesi 15. ve 30. dakikalarda artış gösterirken 60. dakikada 30.dakikanın altına düşmüştür. Papain hidrolizatlarında, % 57.33 ± 3.5 ile 30.dakikada ve % 59.23 ± 5.5 ile 90. dakikada en yüksek değerler gözlenmiştir. Hidrolizin 120.dakikaya kadar devam etmesi ise aktiviteyi % 48.63 ± 5.1 'e düşürmüştür. Bu sonuçlara dayanarak hem en yüksek aktivitenin görülmesi hem de enerji ve zaman tasarrufu dikkate alındığında papain örneklerinde şelatlama aktivitesi için en uygun hidrolizatların % 57.33 ± 3.5 ile 30 dakikalık çörek otu protein hidrolizatlarından elde edildiği söylenebilir.

Tripsin ile hidroliz edilmemiş çörek otu protein konsantresinden alınan % 42.27 ± 5.6 sonucu, 15 ve 30 dakika süreli hidrolizin şelasyon aktivitesini sırasıyla % 14.93 ± 0.0 ve % 32.90 ± 8.7 'ye düşürdüğünü göstermektedir. Hidroliz süresinin artmasıyla; 60.dakikada % 54.91 ± 1.5 ve 90. dakikada % 51.94 ± 1.8 sonuçları elde edilmiştir. Bununla beraber hidroliz süresinin daha fazla uzatılması (120 dakika) ise şelatlama aktivitesinin % 33.05 ± 4.6 ile tekrar hidroliz edilmemiş örneğe göre daha düşük sonuç vermesine neden olmuştur. Tripsin enziminde en yüksek aktivite % 54.91 ± 1.5 ile 60. dakikada elde edilmiştir.



Şekil 39. Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri demir şelasyon aktiviteleri.

Çörek otu protein konsantrelerinin enzimatik hidroliz muamelesinden önce de (t=0) demir şelasyon aktivitesi gösterdikleri görülmektedir. Bununla beraber tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizin demir şelasyonu üzerinde çok belirgin bir etkiye yol açtığı görülmemektedir. Papain ve tripsin enzimlerini kıyaslamak gerekirse; protein papain ile hidroliz edilmesi, hidroliz edilmeyen konsantrelere göre aktiviteyi arttırmıştır. Tripsin ile kısa süreli (15 dakika) hidroliz sonucunda ise aktivite oldukça düşmüştür. Çörek otu protein konsantrelerinin demir şelatlama potansiyeli olmakla beraber; bu aktivitenin, nispeten daha kısa sürede ve enerjiden tasarruf sağlayarak daha etkin biçimde elde edilmesi için papain enziminin tercih edilmesi daha anlamlı görünmektedir.

Bilinen en güçlü demir şelatlayıcılardan biri olduğu için çalışmamızda pozitif kontrol olarak EDTA (Etilendiamintetraasetik asit) bileşiği kullanılmıştır (Song vd., 2014). EDTA ile gerçekleştirilen demir şelasyon aktivitesi testinde % 89.03 ± 4.1 şelasyon aktivitesi

elde edilmiştir. Papain ile 30 dakikalık hidroliz sonucu elde edilen örnekte % 57.33 ± 3.5 ve 60 dakikalık hidroliz sonucu elde edilen örnekte % 59.23 ± 5.5 şelasyon aktivitesi gözlenmiştir. Tripsin ile 60 dakikalık hidroliz sonucunda ise % 54.91 ± 1.5 şelasyon aktivitesi elde edilmiştir. Hidroliz uygulanmamış çörek otu protein konsantresinin ise % 42.27 ± 5.6 oranında şelasyon aktivitesi bulgulanmıştır. Bu sonuçlar çörek otu protein ve hidrolizatlarının demiri şelatlama potansiyeline sahip doğal birer kaynak olduklarını göstermektedir.

4.2.2.3 Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi

Hidrojen peroksidin geçiş metalleriyle indirgenmesi sonucu oluşan (Fenton reaksiyonu) hidroksil radikali (OH^\cdot), yüksek reaktivitesine (9-10 sn) bağlı olarak en fazla toksisiteye sahip olan serbest radikaldir (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Organik asitler, amino asitler, fosfolipitler ve nükleik asitler gibi birçok biyokimyasal madde ile reaksiyona girebilmektedir. Oldukça reaktif olması ve yarılanma ömrünün kısıllığı nedeniyle bulunduğu yerde büyük hasarlar yaratabilmekte ve yeni radikallerin oluşumuna sebebiyet verebilmektedir (Becker, Nissen ve Skibsted, 2004).

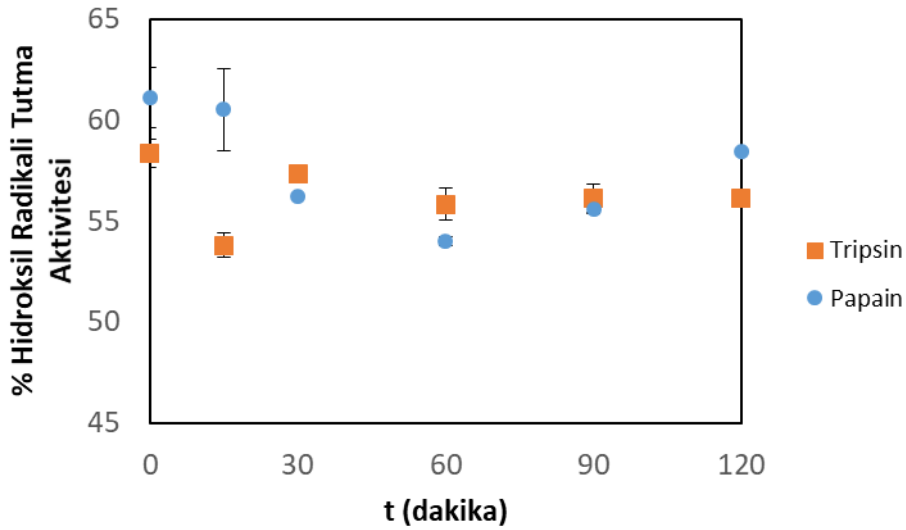
Hidroksil radikali tutma aktivitesi testinde hidroksil radikali *in vitro* koşullarda, Fe^{2+} ve H_2O_2 'nin reaksiyonu sonucu üretilerek test edilen numunenin hidroksil radikalini tutma aktivitesi ölçülmektedir. Antioksidan aktivite gösteren numune aynı zamanda Fe^{2+} iyonunu şelatlama etkisi de göstererek dolaylı olarak hidroksil radikali oluşumunu engelleyebilmektedir. Bu nedenle test edilen numunenin iyi bir şelasyon ya da hidroksil radikali tutma etkisi tam olarak birbirinden ayırt edilememektedir (Becker, Nissen ve Skibsted, 2004).

Çalışmamızda çörek otu protein ve papain ve tripsin enzimleriyle muamelesinde farklı süreler boyunca (15, 30, 60, 90 ve 120 dakika) hidroliz edilmiş örneklerin hidroksil radikalini tutma aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 40 üzerinden incelenebilmektedir.

Hidroliz edilmemiş çörek otu protein konsantresinin ($t=0$) % 61.12 ± 1.5 oranında hidroksil radikali tutma aktivitesi gözlenmiştir. Papain ile gerçekleştirilen hidroliz sonucu elde edilen konsantrelerde 90. dakikadan önce hidroksil radikali tutma aktivitesinde düşüş yaşandığı, 90. ve 120.dakikalarda ise diğer sürelerle göre artış yaşandığı görülmektedir. Hidrolizatlar arasında en yüksek aktivitenin % 60.51 ± 2 ile 15. dakikada elde edilen hidrolizattan alındığı bulgulanmıştır. Bununla beraber papain ile hidroliz

edilmemiş protein konsantresinin tüm hidrolizatlardan daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

Tripsin enzimi ile hidroliz edilmemiş protein konsantresinin hidroksil radikali tutma aktivitesi % 58.35 ± 0.6 oranı ile hidrolizatların aktivitelerinden daha yüksek sonuç vermiştir. Tripsin enzimi hidrolizatlarının hidroksil radikali tutma aktivitelerinin birbirine yakın değerlerde olduğunu söylemek mümkündür. Tripsin enzimi kullanılarak elde edilen hidrolizatlarda en yüksek aktivite % 57.32 ± 0.3 sonucu ile 30 dakika hidroliz edilmiş konsantrede görülmüştür. En düşük aktivite ise % 53.80 ± 0.6 ile 15 dakika hidroliz edilmiş protein konsantresinden elde edilmiştir. Bununla beraber tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizatlarda da aktivitenin, hidroliz edilmemiş protein konsantrelerine göre düşmüş olduğu görülmektedir.



Şekil 40. Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri hidroksil radikali tutma aktiviteleri.

Papain ve tripsin enzimleri kullanılarak farklı sürelerde hidroliz edilmiş örneklerin hidroksil radikali giderme aktiviteleri birbirleri ile benzer sonuçlar vermiştir. Bununla beraber her iki enzim de aktiviteyi düşürmüştür. Çörek otu protein ekstraktından, hidroliz örneklerine göre daha yüksek aktivite değerleri alınması hidroliz olmaksızın çörek otu proteinlerinin hidroksil radikali giderme aktivitesini göstermektedir. Bu sonuçlara dayanarak; enzimatik hidroliz gerçekleştirilmeksizin zaman ve enerji tasarrufu sağlayarak çörek otu proteinlerinin oldukça reaktif olan hidroksil radikalini giderme potansiyelinin değerlendirilebileceği söylenebilir.



Antioksidatif özelliklerinin araştırılması amacıyla DPPH inhibisyonu, demir şelasyon aktivitesi ve hidroksil radikali tutma aktivitesi testleri uygulanan çörek otu protein konsantreleri ve farklı sürelerde (15, 30, 60, 90 ve 120) papain ve tripsin ile gerçekleştirilen hidroliz sonucu elde edilen hidrolizatlarının antioksidatif aktiviteleri değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda tüm testlerde hem çörek otu protein konsantrelerinin hem de hidrolizatlarının antioksidatif aktiviteye sahip oldukları görülmüştür. DPPH testinde en yüksek aktivite % 59.80 ± 2.6 oranı ile 120 dakikalık papain hidrolizatına aitken; demir şelasyon testinde en yüksek aktivite % 59.23 ± 5.5 ile 90 dakikalık papain hidrolizatına; hidroksil radikali tutma aktivitesi testinde en yüksek aktivite ise hidroliz edilmemiş protein konsantresinden (% 61.12 ± 1.48) sonra % 60.51 ± 2.02 oranı ile 15 dakikalık papain hidrolizatına aittir.

Yapılan tüm anti-oksidatif aktivite testlerini değerlendirmek gerekirse en yüksek anti-oksidatif aktivite % 61.12 ± 1.48 oranı ile hidroliz edilmemiş çörek otu protein konsantresinin hidroksil radikali tutma aktivitesine aittir. Papain enziminin tüm testlerde en yüksek aktivitesine 30 dakikalık hidroliz sonucu elde edilen hidrolizatlar ile yaklaştığını ve bu nedenle bu sürede elde edilen hidrolizatların fraksiyonlanmasına karar verildiğini söylemek mümkündür. Fraksiyonlama ile daha yüksek oranda anti-oksidatif etki gösterecek hidrolizatların elde edilmesi ve bu hidrolizatların LC-MS/MS analizi ile peptit yapılarının detaylandırılması amaçlanmıştır. Yapılan tüm bu çalışmalarla, anti-oksidatif etki görülen çörek otu protein konsantrelerinde biyoaktif peptit varlığı araştırılmaktadır.

4.2.3 Çörek otu protein hidrolizatlarının fraksiyonlanması

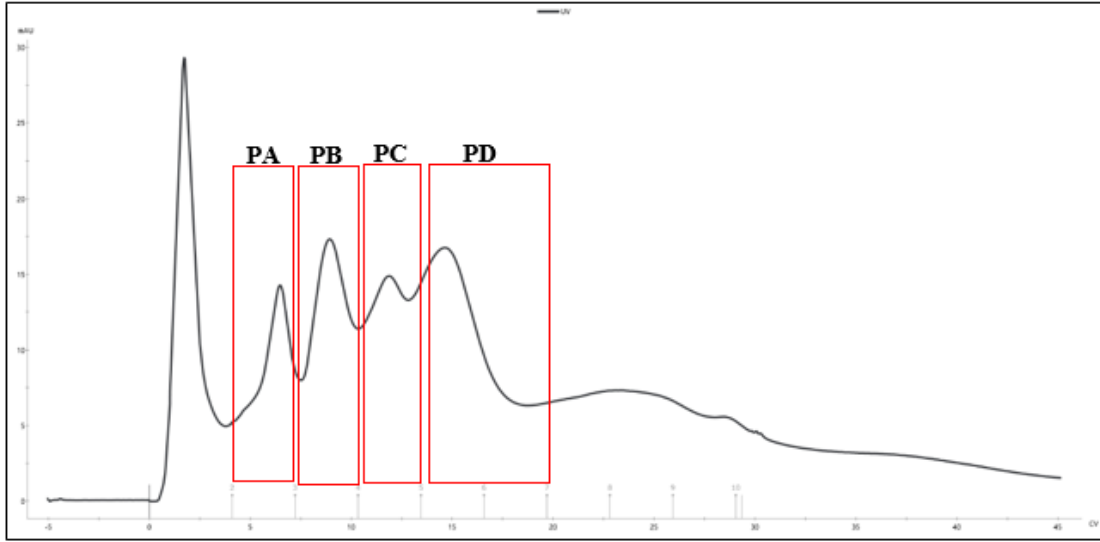
Çörek otu protein konsantreleri ve farklı sürelerde papain ve tripsin enzimleri kullanılarak elde edilen hidrolizatlarla yapılan analizler sonucunda; anti-oksidatif ve anti-Alzheimer testlerinde maksimum aktivitelere yakın sonuçlar alındığı için 30 dakikalık papain ve tripsin hidrolizatlarının fraksiyonlanması uygun görülmüştür.

Papain hidrolizatları için 0-100 LG (lineer gradient) sabit olmak üzere 0.6 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Capto DEAE 25 CV (column volume); 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Capto DEAE 25 CV; 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml DEAE FF (zayıf anyonik) 25 ve 35 CV; 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Capto Q (güçlü anyonik) 20, 25, 35 ve 40 CV; 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Capto S (katyonik) 20 ve 35 CV; 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Butyl FF (zayıf katyonik) 20 CV parametreleri ile fraksiyonlama denemeleri yapılmıştır.

Tripsin hidrolizatları için 0-100 LG (linear gradient) sabit olmak üzere 0.5 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Capto DEAE 25 ve 40 CV; 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Capto DEAE 20 ve 30 CV; 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml DEAE FF 25 ve 35 CV; 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Capto Q 20 ve 35 CV; 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Capto S 20 ve 35 CV parametreleri ile fraksiyonlama denemeleri yapılmıştır.

Farklı parametrelerle gerçekleştirilen fraksiyonlama denemeleri sonucunda en güçlü peptit sinyalleri; anyon değişim kolonu olan HiTrap 1 ml Capto DEAE (zayıf anyonik) kolonu, 1 M tuz konsantrasyonu ve 0-100 LG 35 CV parametreleri ile papain hidrolizatlarından elde edilmiştir. PA, PB, PC ve PD olmak üzere 4 adet fraksiyon toplanmıştır. Papain fraksiyonuna ait kromatogram Şekil 41’de verilmiştir.

30 dakika papain enzimi hidroliz ile optimum sonuçlar alınması nedeniyle daha kısa sürede, daha az enerji tüketilerek elde edilebilecek biyoaktif peptitlerin fraksiyonlanarak araştırılması hedeflenmiştir. Fraksiyonların antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amacıyla DPPH analizinin yapılmasına karar verilmiştir.



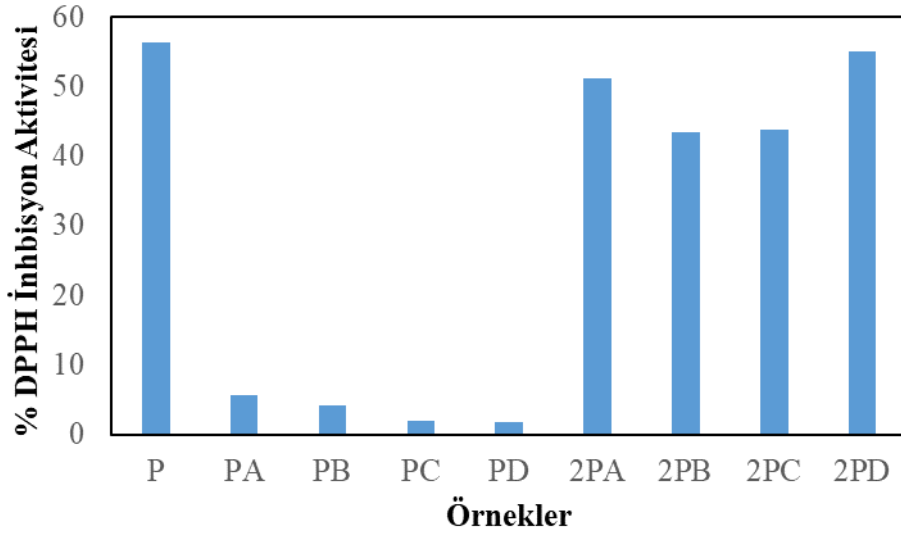
Şekil 41. Papain ile 30 dakika hidroliz edilmiş çörek otu protein ekstraktlarının HiTrap 1 ml Capto DEAE (zayıf anyonik) kolon ve 35 CV ile fraksiyonlanma ve elde edilen 4 (PA, PB, PC ve PD) fraksiyonun kromatogramı.

4.2.4 Fraksiyonlanmış peptitlerin DPPH analizi

Çörek otu protein konsantrasyonunun papain enzimi ile 30 dakika hidroliz edilmesi sonucu 4 adet fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonlar PA, PB, PC ve PD olarak adlandırılmıştır. Her bir fraksiyonun konsantrasyonu iki katına çıkarılarak DPPH testi tekrarlanmıştır.

Hacimsel olarak İki katına çıkarılan fraksiyonlar; PA için 2PA, PB için 2PB, PC için 2PC ve PD için 2PD olarak adlandırılmıştır. Hidroliz edilmemiş protein konsantresi ise P olarak adlandırılmıştır. Fraksiyonlanmış çörek otu protein hidrolizatlarının ve protein konsantresinin DPPH testi sonuçları Şekil 42’de verilmiştir.

Fraksiyonlanmış 4 adet çörek otu protein konsantresi hidrolizalarına (PA, PB, PC ve PD) uygulanan DPPH testi sonucunda, fraksiyonlanmamış hidrolizatların DPPH testi sonuçlarına (Şekil 33) göre sırasıyla % 5.55, % 4,16, % 1.92 ve % 1.71 olmak üzere oldukça düşük aktiviteler elde edilmiştir. DPPH radikale karşı düşük anti-oksidatif etki elde edilmesi, peptit fraksiyonları içerisinde birçok bileşen olması nedeniyle (tampon çözeltiler, tuz vb.) etken madde olan çörek otu protein fraksiyonu konsantrasyonunun çok düşük kalmasıyla ilgili olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 42. Çörek otu protein konsantresinin (P), papain enzimi ile 30 dakikalık hidrolizi sonrası fraksiyonlanmış protein hidrolizatların (PA, PB, PC ve PD) ve bu hidrolizat konsantrasyonlarının hacmen iki katına çıkarılmış (2PA, 2PB, 2PC VE 2PD) örneklerinin DPPH inhibisyon aktiviteleri (standart sapma < % 5).

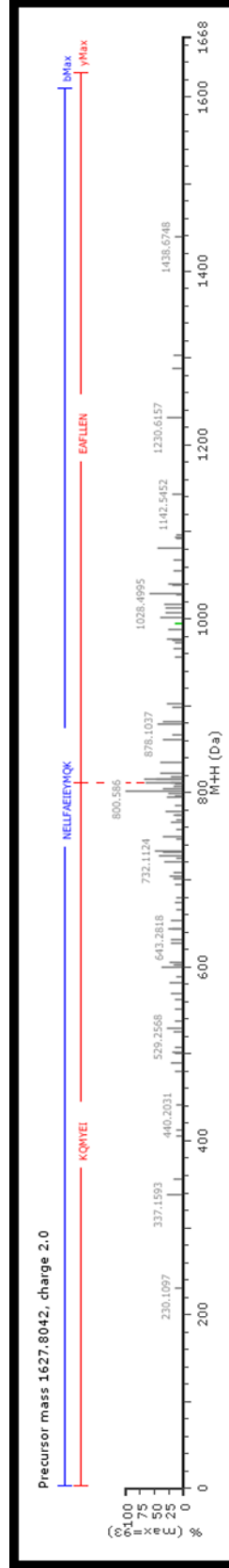
Peptit konsantrasyonunun ortamda çok düşük kalmış olabileceği fikrine dayanarak DPPH testi, analizde kullanılan fraksiyon konsantrasyonu iki katına çıkarılarak tekrarlanmıştır. Yapılan bu değişiklik sonucunda fraksiyonların DPPH radikale karşı gösterdikleri anti-oksidatif etki sırasıyla % 51.16, % 43.41, % 43.90 ve % 55.08 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre PA, PB, PC ve PD fraksiyonlarının, hidrolizatlar toplanırken fraksiyon cihazından gelen tampon, tuz vb. etkenler nedeniyle test ortamında düşük kaldığı ve bu nedenle düşük antioksidatif aktivite gösterdiklerini söylemek mümkündür.

Protein ve peptitlerin fraksiyonlanması işlemi oldukça uzun süren ve maliyetli bir uygulamadır. Bu nedenle; fraksiyonlanmış çörek otu protein hidrolizatlarının, enzim ile hidrolize edilmemiş ve fraksiyonlanmamış çörek otu protein konsantresi ile kıyaslanması uygun görülmüştür. Çörek otu protein konsantresi ile yapılan DPPH testi sonucu % 56.43 oranı ile fraksiyonların konsantrelerinin iki katına çıkarılmadan yapılan analiz sonuçlarına göre oldukça yüksek çıkmıştır. Fraksiyon konsantrasyonlarının iki katına çıkarılmasıyla ise konsantrasyonu artırılmış fraksiyonların DPPH testi sonuçları birbirine yakın değerlerde (% 51.16, % 43.41, % 43.90 ve % 55.08) elde edilmiştir. Buradaki kritik nokta ise antioksidatif etkiyi gösteren etken maddenin konsantrasyonu ve her bir etken maddenin bağıl etkinliğidir. Fraksiyonlanmış örneklerin konsantrasyonlarının artırılmasıyla aktivitenin de artması antioksidatif etki gösterecek peptitlerin varlığına işaret etmektedir. Bununla beraber, enzimatik işlem ya da fraksiyonlama işlemi olmaksızın çörek otu protein konsantrelerinin antioksidan etki göstereceği göz önünde bulundurulmalıdır.

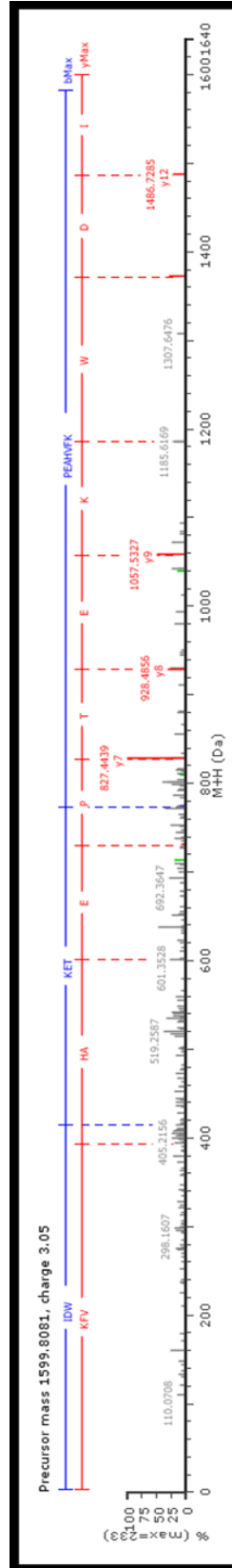
4.2.5 LC MS/MS analizi

Önceki bölümlerde (tripsin ve papain muameleleri) tarif edildiği üzere anti-asetilkolinesteraz aktivitesi ve antioksidatif aktivite gösteren fraksiyonlar toplanarak uygun LC/MS-MS analiz teknikleriyle incelenmiştir. Bu bağlamda elde edilen bazı örnek spektrumlar aşağıda sunulmaktadır (Şekil 43-45). Özellikle papain muamelelerinde antioksidatif fraksiyonların başarılı bulunduğu göz önüne alınarak bu fraksiyonlar LC/MS-MS analizlerine tabi tutulmuştur.

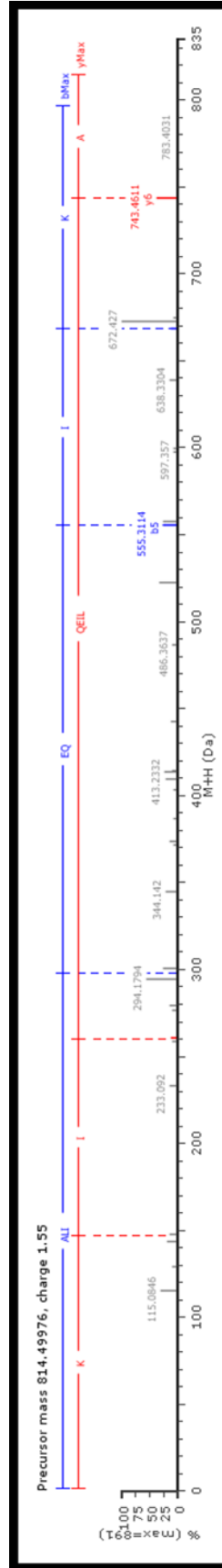
Ekibimizin elinde şu anda bu aktif fraksiyonlarda bulunmuş 16 farklı peptit spektrumu vardır. Dolayısıyla sadece örnek birkaç sunum yapılacaktır.



Şekil 43. PA fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum NELLFAEIEYMQK peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.



Şekil 44. PB fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum IDWKETPEAHVFK peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.



Şekil 45. PC fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum ALIEQIK peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.

Ekibimizin elinde şu anda bu aktif fraksiyonlarda bulunmuş 16 farklı peptit spektrumu vardır. Özetle, çalıştığımız proteinlerden elde edilen enzimatik hidrolizatların fraksiyonlarını aldıktan sonra peptit yapılarını aydınlatmak için LC-Q-TOF-MS sisteminde analizler tamamlanmıştır. Analiz edilen peptit moleküllerini Uniprot, PLGS, vb. data bankalarındaki proteinlerle eşleştirerek peptit moleküllerinin yapıları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ancak bazı peptit moleküllerinin yapıları bu yolla belirlenememiştir. Bu durum yeni protein varlığına ya da daha önce bu data bankalarına işlenmemiş çörek otu proteinlerine işaret etmektedir. Dolayısıyla, *de novo* sekanslama yapılması gerekmektedir. Bu durum ekstra bir maliyet ve iş yükü oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu aşamada bu işlemlerin tamamlanması olanağı bulunmamaktadır.

4.2.6 *In Silico* Analizler

LC/MS-MS Analizi sonucunda ilgili veri tabanları ile karşılaştırmalar yapılarak numunelerde bulunan peptitlerin dizilimleri (sekansları), moleküler ağırlıkları ve muhtemel olarak hangi çörek otu proteininden koptukları belirlenmiştir (Tablo 12-17). Buna ek olarak, literatürde tarif edilen bir dizi *in silico* analiz tekniği kullanılarak peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi işlemleri tamamlanmıştır (Tablo 12-17).

Tablo 12-17 üzerinden incelenebileceği gibi peptitlerin hiçbirinde toksik etkiler ortaya çıkması beklenmemektedir.

Sayınca az da olsalar 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 anlaşılacağı gibi, bu peptitlerle ilgili bir literatür bulunmamaktadır. Buna ek olarak, şu aşamada elde edilen bazı sinyaller veri tabanlarında olan proteinlerle eşleşmemiştir. Dolayısıyla bulgularımızın bir kısmı yeni protein ve peptit ürünlerine işaret etmektedir. Grubumuzun bu bağlamda patent başvurusu ön hazırlığı hâlihazırda devam etmektedir. Bu konu ile ilgili verilerin değerlendirilmesi çalışmaları da benzer şekilde sürdürülmektedir. Anti-oksidatif fraksiyonlardan analizi tamamlanmış 16 farklı peptit bulunmaktadır. Bu peptitlerle ilgili değerlendirmeler aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir (Tablo 12-17).

Tablo 12. LC/MS-MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PA fraksiyonunun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.

Fraksiyon PA				
Peptit No	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	Protein Kaynağı	pI
1	ASADTSNTGSVSE-ANAQYYQQEAGKLK	2820,27	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	4.68
2	GRLYEYSNNSVK	1429,71	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	8.83
3	NELLFAEIEYMQK	1643,796	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	4.26
4	NELLFAEIEYMQKR	1783,891	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	4.79
5	NFLQVNLLLEANNNYSR	1910,915	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	6.35
6	QVTFCK	782,3929	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	8.57
7	TQQHMSLMPTN-EYEVISSAPFDSR	2768,246	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	4.66

Tablo 13. LC/MS-MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PA fraksiyonunun biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Peptit No	Toksosite	Peptide Ranker	Aktivite	A Parametresi	B Parametresi
1	toksik değil	0,5632	antioksidatif	0.1111	-
2	toksik değil	0,168664	antioksidatif	0.1667	-
3	toksik değil	0,222255	antioksidatif	0.0769	-
4	toksik değil	0,2752	antioksidatif	0.0714	-
5	toksik değil	0,206773	ACE inhibitör	0.2500	0.0032733-199227497
6	toksik değil	0,34829	antioksidatif	0.1667	-
7	toksik değil	0,120965	ACE inhibitör	0.2500	0.015794-466320564

PA fraksiyonunda biyoaktif olma ihtimali (PeptideRanker değeri) > % 50 olan bir peptit bulunmuştur (ASADTSNTGSVSEANAQYYQQEAGKLG).

In silico değerlendirmelerde, antioksidatif peptitler ile ilgili olarak öncelikle anti-oksidatif parametreler sıralanmıştır. Bu parametrelerin hesaplanamadığı durumlarda ACE inhibisyon parametreleri listeye eklenmiştir.

Tablo 14. LC/MS-MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PB fraksiyonunun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.

Fraksiyon PB				
Peptit No	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	Protein Kaynağı	pI
1	ENLPTK	701,3828	hypothetical protein AQUUCO_05500003v1 [Aquilegia coerulea]	6,6
2	ENLPTK-DQISPYFR	1707,871	hypothetical protein AQUUCO_05500003v1 [Aquilegia coerulea]	6,65
3	IDWKET-PEAHVFK	1599,808	hypothetical protein AQUUCO_03000169v1 [Aquilegia coerulea]	5,26
4	LAICQVVG-DDLLMSNPK	1872,956	hypothetical protein AQUUCO_00300193v1 [Aquilegia coerulea]	3,94
5	LPENA-KVDEVK	1241,664	hypothetical protein AQUUCO_03000169v1 [Aquilegia coerulea]	4,57
6	PICESLNILE-YIDEIWPVHR	2511,221	hypothetical protein AQUUCO_05500003v1 [Aquilegia coerulea]	4,28
7	SIEISG	605,3133	hypothetical protein AQUUCO_03000169v1 [Aquilegia coerulea]	3,64
8	YDLDFK	800,3825	hypothetical protein AQUUCO_00300193v1 [Aquilegia coerulea]	3,94

Tablo 15. LC/MS-MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PB fraksiyonunun biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Peptit No	Toksosite	Peptide Ranker	Aktivite	A Parametresi	B Parametresi
1	toksik değil	0,5632	ACE inhibitör	0.134613	-

2	toksik değil	0,168664	antioksidatif	0.230629	-
3	toksik değil	0,222255	antioksidatif	0.303865	-
4	toksik değil	0,222255	ACE inhibitör	0.349182	0.017499-924998687
5	toksik değil	0,2752	ACE inhibitör	0.0855059	0.006993-006993007
6	toksik değil	0,206773	antioksidatif	0.521679	
7	toksik değil	0,34829	ACE inhibitör	0.120602	1.9607843-137255E-5
8	toksik değil	0,120965	ACE inhibitör	0.557286	0.0004590-1037363444

PB fraksiyonunda biyoaktif olma ihtimali (PeptideRanker değeri) > %50 olan 2 peptit bulunmuştur (PICESLNILEYIDEIWP HNR ve YDLDFK).

Tablo 16. LC/MS-MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PC fraksiyonunun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.

Fraksiyon PC				
Peptit No	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	Protein Kaynağı	pI
1	AICLHPLVC-KGFNADFD-GDQMAVHI-PLSLEAQAEAR	3994,926	RNA polimeraz beta (kloroplast) [<i>Nigella damascena</i>]	4,8
2	ELGEEGP-ADNEWEDR	1745,717	RNA polimeraz beta (kloroplast) [<i>Nigella damascena</i>]	3,72
3	GLFEYEIQSWK	1399,6711	RNA polimeraz beta (kloroplast) [<i>Nigella damascena</i>]	4,54
4	PTPGEL-VMCQEK	1388,6486	RNA polimeraz beta (kloroplast) [<i>Nigella damascena</i>]	4,54

5	RVDYSGR	852,4402	RNA polimeraz beta (kloroplast) [<i>Nigella damascena</i>]	9,1
---	---------	----------	--	-----

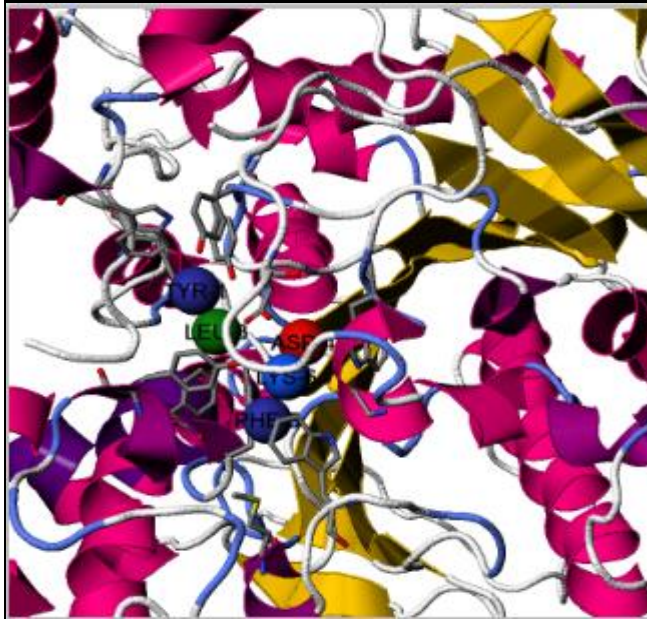
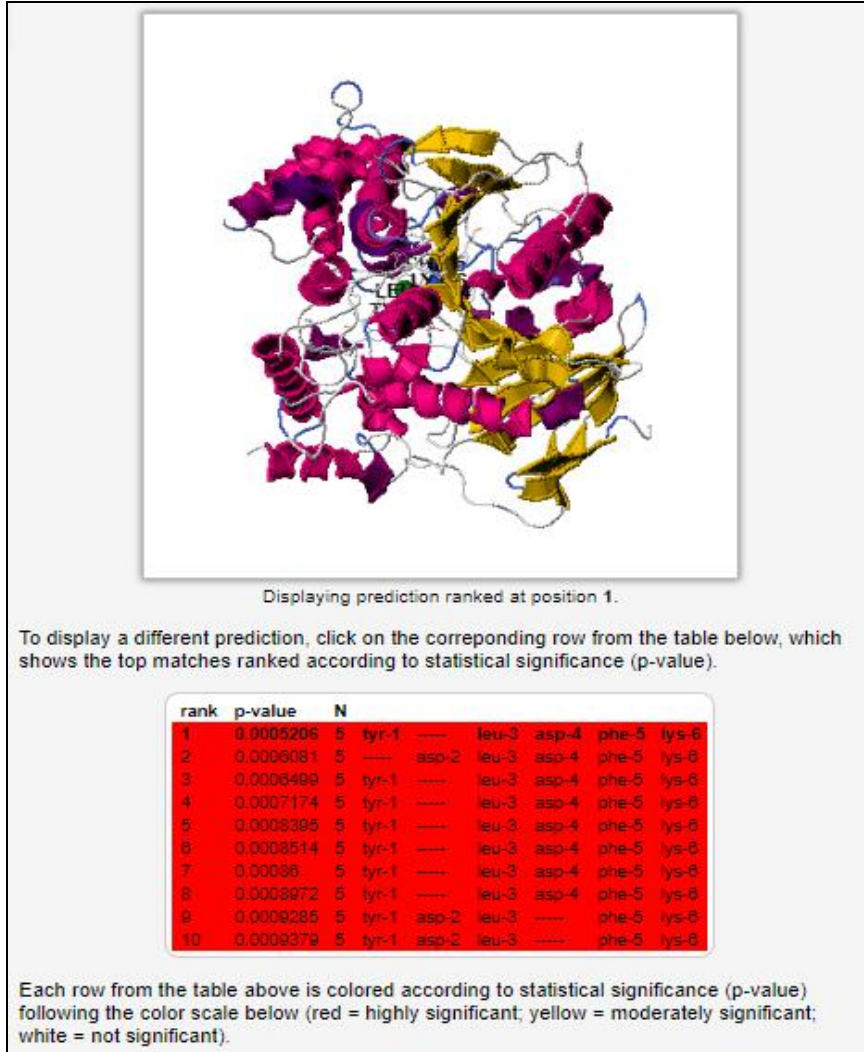
Tablo 17. LC/MS-MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PC fraksiyonunun biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Fraksiyon PC					
Peptit No	Toksosite	Peptide Ranker	Aktivite	A Parametresi	B Parametresi
1	toksik değil	0,040593	antioksidatif	0.0556	-
2	toksik değil	0,219454	antioksidatif	0.0667	-
3	toksik değil	0,378953	ACE inhibitör	0.4545	0.034362245010862
4	toksik değil	0,218156	antioksidatif	0.0833	-
5	toksik değil	0,221694	ACE inhibitör	0.4286	0.0014900210084034

PC fraksiyonunda biyoaktif olma ihtimali (PeptideRanker değeri) > %50 olan hiçbir peptit bulunamamıştır.

Bu değerlendirmeler sonucunda, aktif fraksiyonlarının içinde hem aktif, hem de aktif olmayan peptitlerin bulunduğu anlaşılmıştır. Mooney vd. (2012) referansına göre (PeptideRanker) peptitlerin muhtemel biyoaktiveleri sıralanmıştır. Bunun yanında, Minkiewicz vd. (2008) referansına göre, peptitlerin (eğer varsa) antioksidatif inhibisyon potansiyelleri incelenmiştir. Bu bağlamda hem *in vitro* antioksidatif aktivitesi bulgularan, hem de bu aktiviteleri *in silico* tekniklerce doğrulanan 1 örnek peptidin asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyon mekanizması incelenmiştir (Trabuco vd. 2012 – PepSite2). Bu bağlamda aşağıdaki Şekil 46 ve Tablo 18'de söz konusu inhibitör peptitlerin AChE ile etkileşim mekanizması incelenmiş ve bu inhibitörlerin AChE'nin hangi amino asitleri ile etkileşebileceği özetlenmiştir.

In vitro antioksidatif analizler ve AChE analizleri aynı fraksiyonlarla yürütüldüğü için burada gözlenen en etkin peptitlerden biri ile AChE etkileşimleri de incelenmiştir.



Şekil 46. PB fraksiyonu peptitleri arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan YDLDFK peptidinin AChE 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 18. YDLDFK peptidinin AChE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Sekans	Aktif Amino Asitler	p-Değeri	AChE üzerinde Bağlanılan Amino Asitler
YDLDFK	Tyr-1 Leu-3 Asp-4 Phe-5 Lys-6	0.0005206	Tyr72, Asp74, Gly82, Trp86, Tyr124, Trp286, Phe297, Tyr337, Phe338, Tyr341, Tyr439, Met443

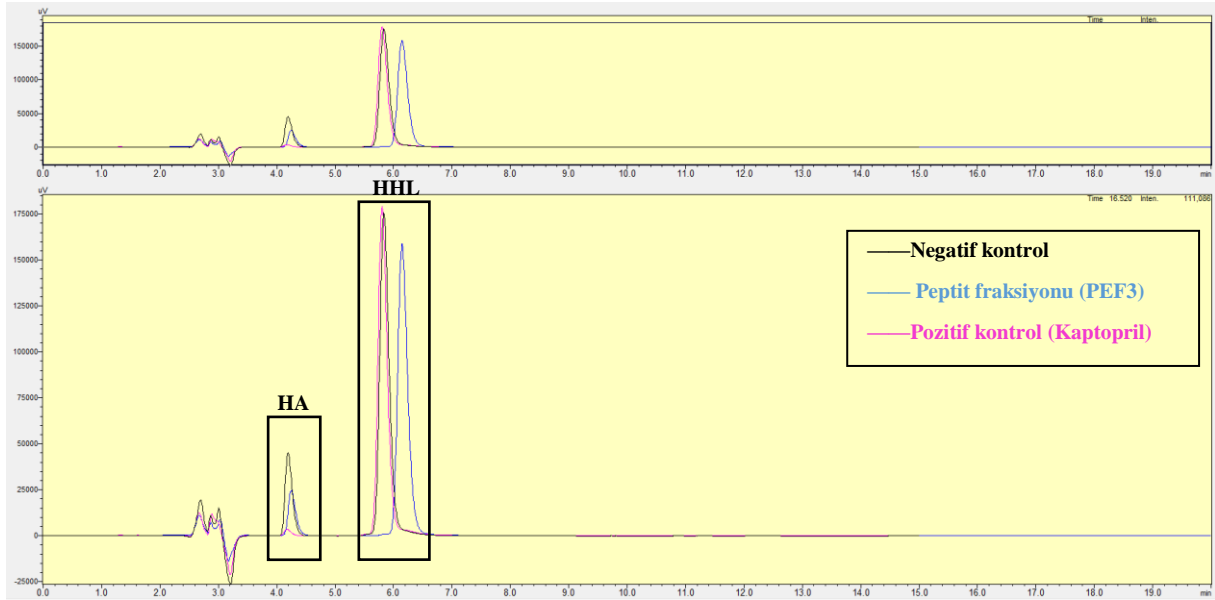
Dolayısıyla en muhtemel modele göre 6 amino asitten oluşan YDLDFK peptidi, AChE üzerinde 12 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir ve bu sayede inhibisyona sebep olabilmektedir. Modelin etkinliğini göstermek için AChE'nin toplamda 614 amino asit uzunluğunda olduğu da belirtilmelidir.

4.3 Fındık proteinlerinin pepsin, bromelain ve papain muameleleri ile ilgili çalışmalar

4.3.1. ACE önleyici aktivite testi

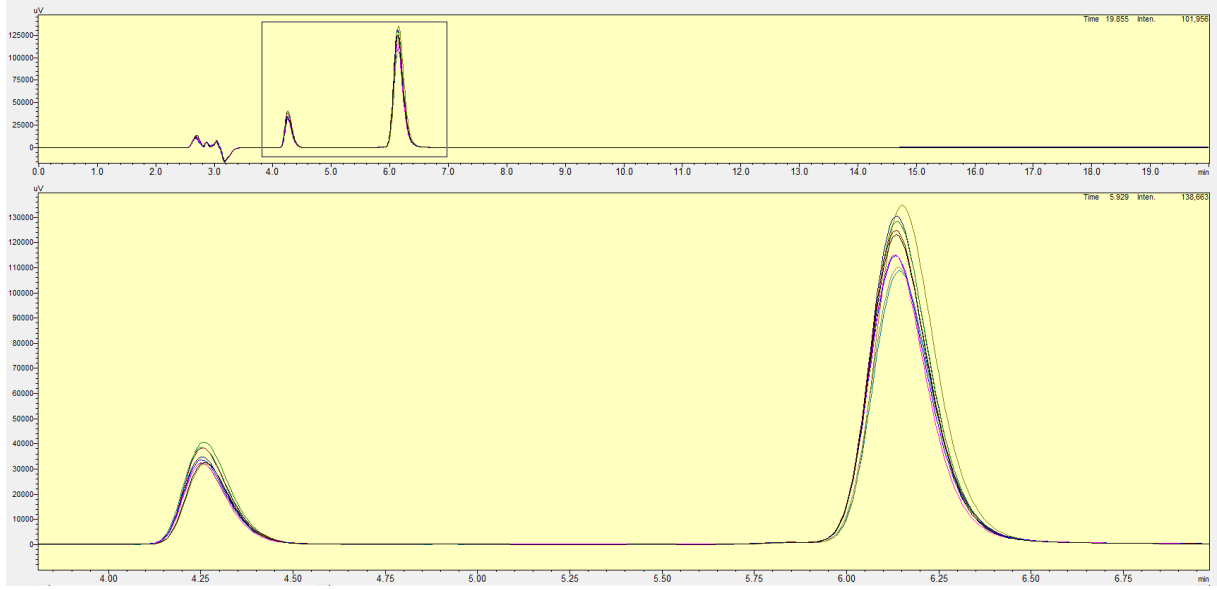
Hippürik asit (Sigma, 68069-50 mg) standartı 0,1-1000 nM konsantrasyonlarında hazırlanarak HA kalibrasyon grafiği kullanılarak kantitatif ACE inhibisyonu da hesaplanmıştır.

Şekil 47’de negatif kontrol, pozitif kontrol ve fraksiyonlardan birine ait kromotogram 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.



Şekil 47. Negatif ve pozitif kontrole göre peptit fraksiyonu HA alanı

Şekil 48’de papain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının HA alanlarına ait kromotogram görüntüsü verilmiştir. Fraksiyonların negatif kontrole göre farklı oranlarda HA alanında azalmaya neden olduğu görülmüştür.

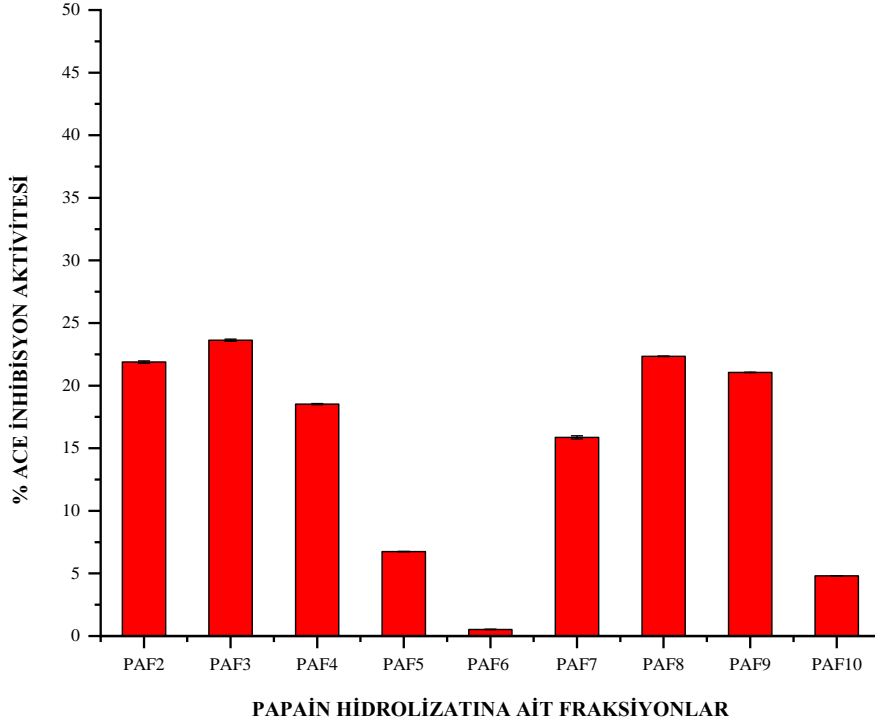


Şekil 48. Papain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının HA alanları

Tablo 19’da papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %ACE inhibisyon aktivitesi değerleri verilmiştir. Hidrolizatın ve out tamamının en yüksek %ACE inhibisyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PAF3, PAF8 ve PAF2 göstermektedir (Şekil 48).

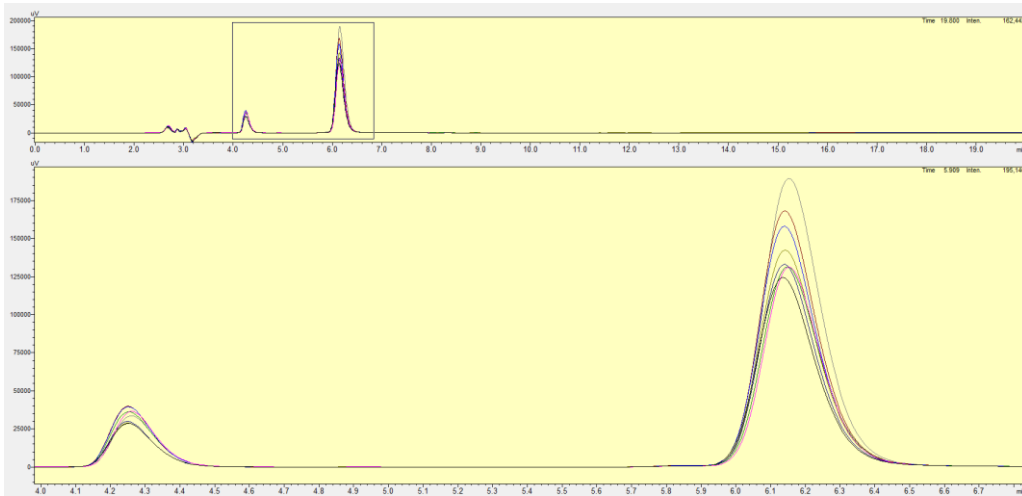
Tablo 19. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %ACE inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %ACE İnhibisyon Aktivitesi
Papain hidrolizatı	98,62±0,18
PA out tamamı	93,13±0,09
PA out fraksiyonu	47,23±0,20
PAF2	21,88±0,09
PAF3	23,63±0,08
PAF4	18,52±0,04
PAF5	6,75±0,01
PAF6	0,53±0,01
PAF7	15,86±0,12
PAF8	22,34±0,01
PAF9	21,05±0,00
PAF10	4,81±0,00



Şekil 49. Papain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivite değerleri

Şekil 50’de bromelain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının HA alanlarına ait kromotogram görüntüsü verilmiştir. Fraksiyonların negatif kontrole göre farklı oranlarda HA alanında azalmaya neden olduğu görülmüştür.

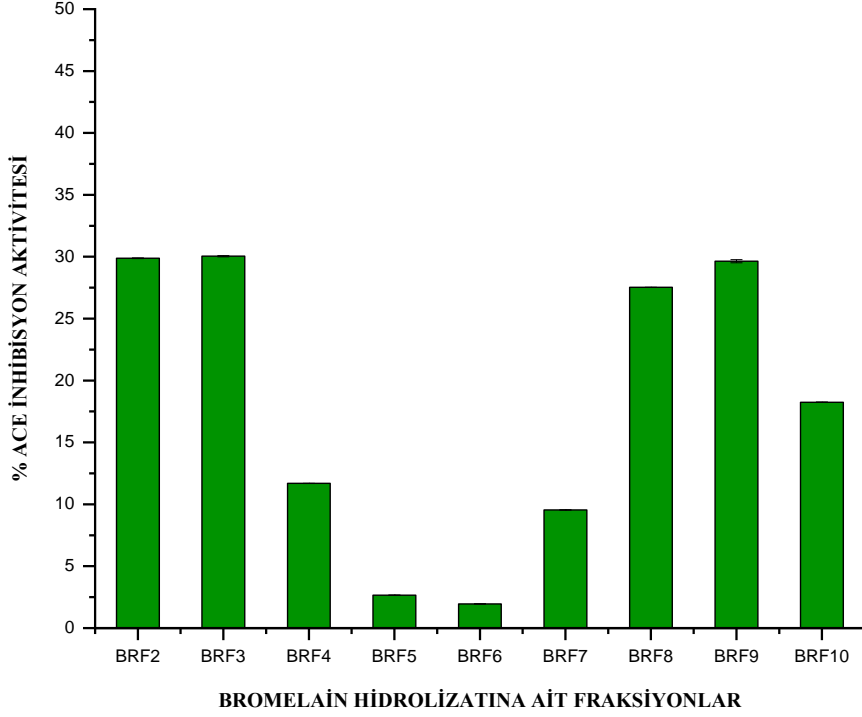


Şekil 50. Bromelain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının HA alanlarının kıyaslanması.

Tablo 20’de bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %ACE inhibisyon aktivitesi değerleri verilmiştir. Hidrolizatın ve out tamamının en yüksek %ACE inhibisyon aktivitesine sahip olduğu grlmştir. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla BRF3, BRF2 ve BRF9 göstermektedir (şekil 1).

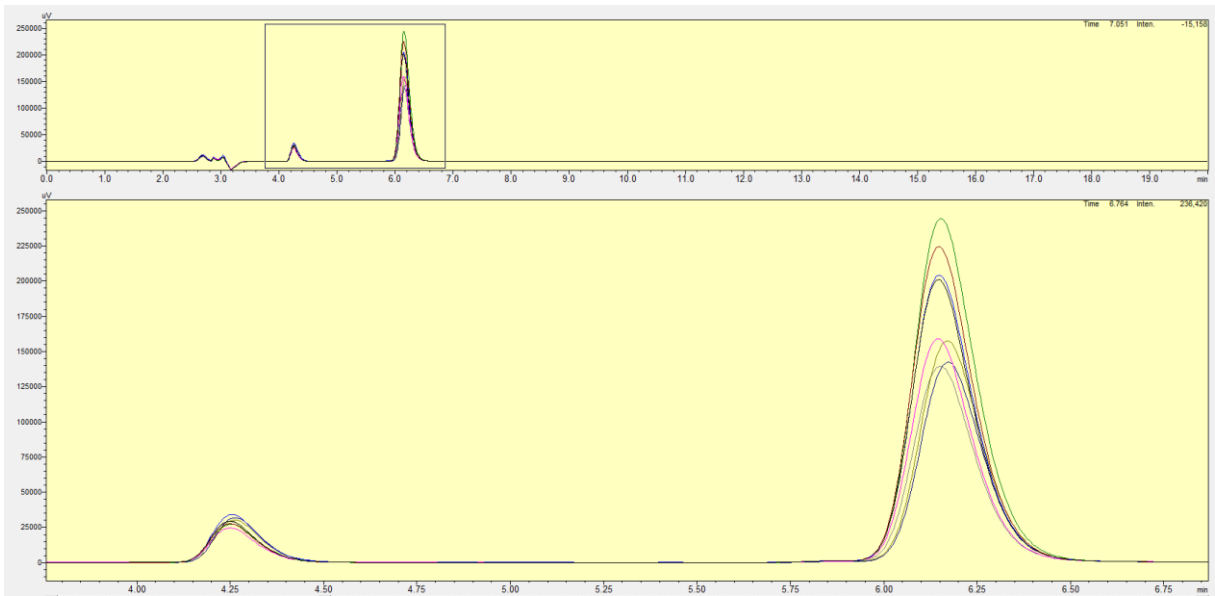
Tablo 20. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %ACE inhibe edici aktivite değerleri

rnek	Ortalama %ACE İnhibisyon Aktivitesi
Bromelain hidrolizatı	86,98±0,13
BR out tamamı	63,00±0,31
BR out fraksiyonu	48,24±0,01
BRF2	29,88±0,03
BRF3	30,04±0,05
BRF4	11,69±0,01
BRF5	2,66±0,00
BRF6	1,95±0,01
BRF7	9,54±0,00
BRF8	27,53±0,01
BRF9	29,64±0,12
BRF10	18,25±0,01



Şekil 51. Bromelain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri

Şekil 52’de pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının HA alanlarına ait kromotogram görüntüsü verilmiştir. Fraksiyonların negatif kontrole göre farklı oranlarda HA alanında azalmaya neden olduğu görülmüştür.

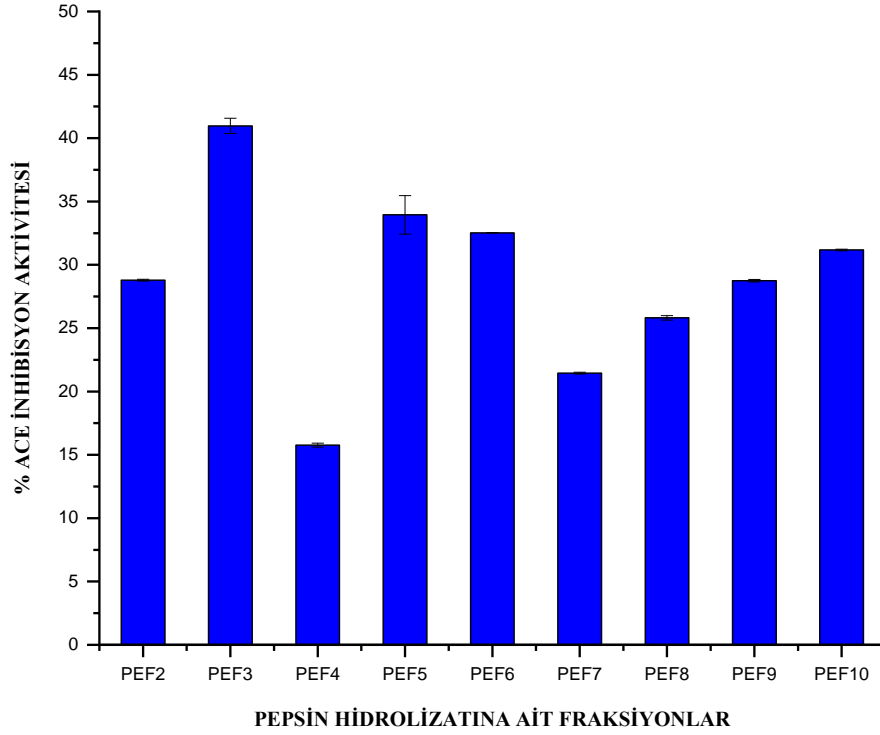


Şekil 52. Pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının HA alanları

Tablo 21’de pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %ACE inhibisyon aktivitesi değerleri verilmiştir. Hidrolizatın ve out tamamının en yüksek %ACE inhibisyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PEF3, PEF5 ve PEF6 göstermektedir (şekil 53).

Tablo 21. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %ACE inhibisyon aktivitesi değerleri

rnek	Ortalama %ACE İnhibisyon Aktivitesi
Pepsin hidrolizatı	98,47±0,11
PE out tamamı	96,42±0,08
PE out fraksiyonu	85,36±0,21
PEF2	28,79±0,07
PEF3	40,97±0,60
PEF4	15,77±0,15
PEF5	33,95±1,52
PEF6	32,52±0,00
PEF7	21,45±0,07
PEF8	25,81±0,17
PEF9	28,74±0,10
PEF10	31,18±0,06

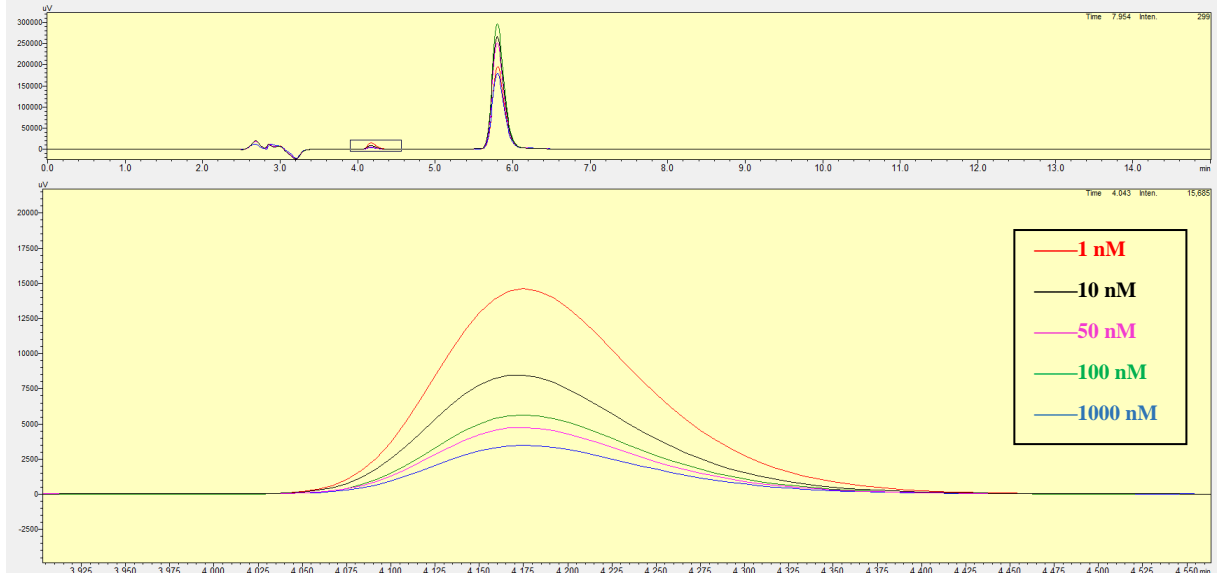


Şekil 53. Pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri

ACE inhibisyon aktivitesi gösteren peptitlerin sentetik bir ACE inhibitörü olan kaptoprile göre kıyaslanması açısından kaptopril farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak çalışılmıştır (Tablo 22). Şekil 54 üzerinde kaptoprile ait kromotogram görüntüsünde kaptopril konsantrasyonunun artmasıyla HA alanının da azaldığı görülmektedir.

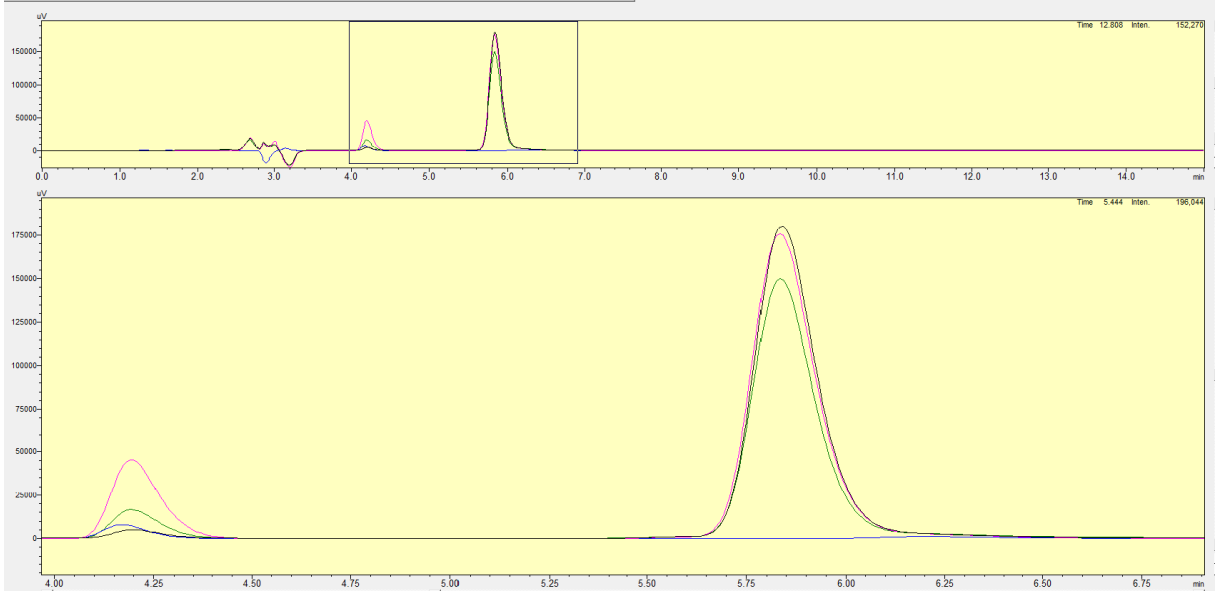
Tablo 22. Kaptoprile ait ortalama %ACE inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %ACE İnhibisyon Aktivitesi
Kaptopril 1 nM	68,93±1,19
Kaptopril 5 nM	81,20±0,40
Kaptopril 10 nM	84,56±1,84
Kaptopril 25 nM	92,92±0,03
Kaptopril 50 nM	92,48±0,55
Kaptopril 100 nM	90,00±0,27
Kaptopril 1000 nM	95,23±0,12

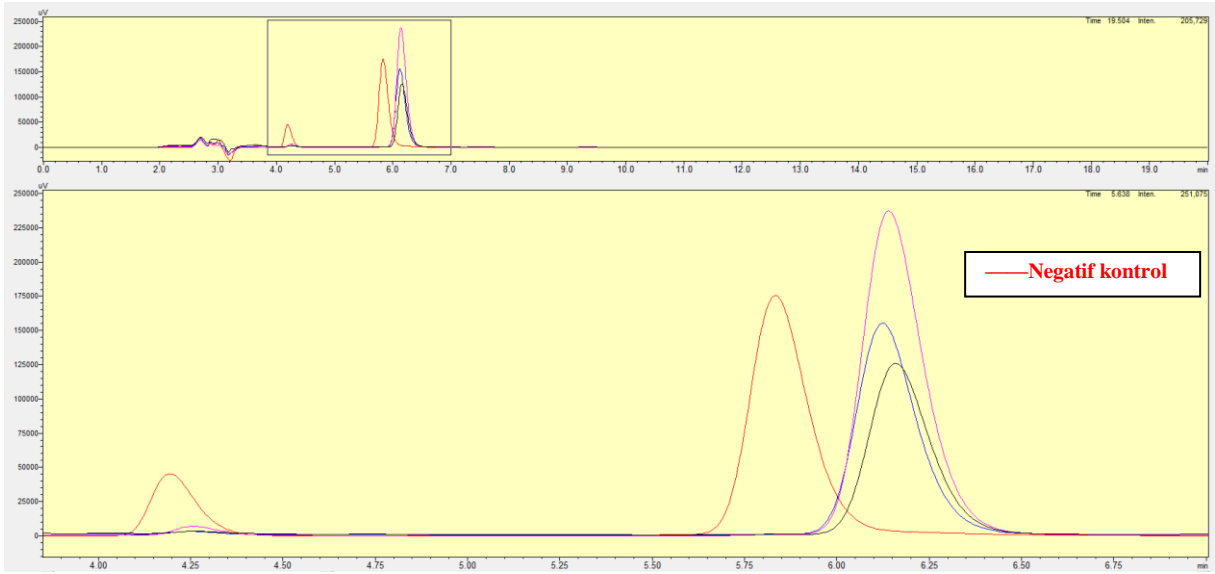


Şekil 54. Kaptopril (pozitif kontrol) için farklı konsantrasyonlardaki hippürük asit alanları

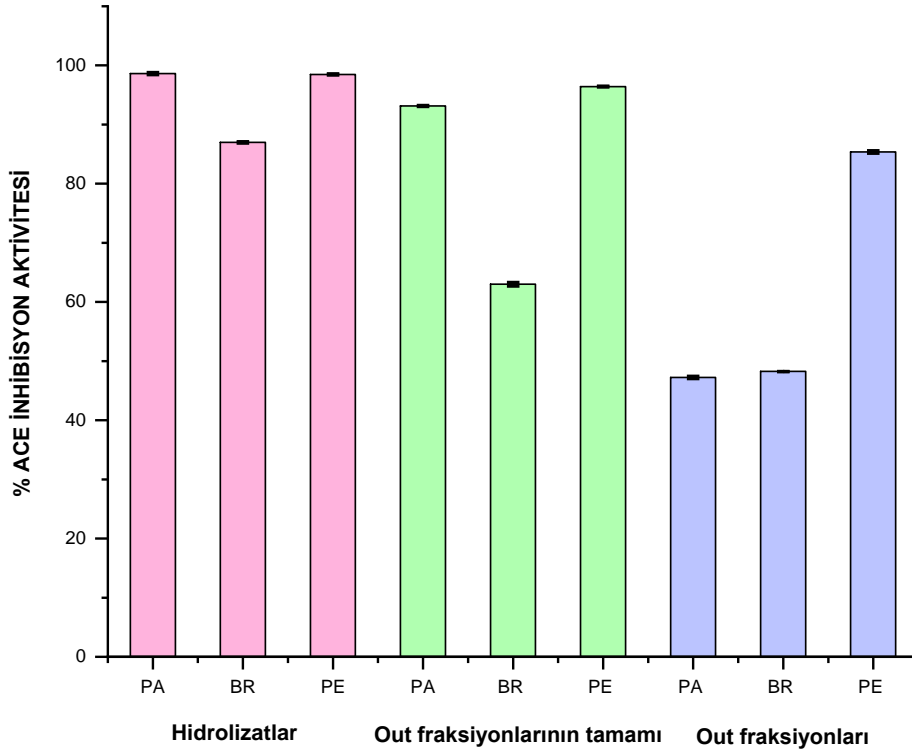
Yapılan çalışmada üç farklı enzimle elde edilen hidrolizatlardan, en yüksek aktivitenin hidrolizatlara ve out kısmına ait olduğu görülmüştür. Papain, bromelain, pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatlarının ve out kısmının kromotogram görüntüleri Şekil 55 ve 56'da verilmiştir. Bunun nedeninin hidrolizat ve out kısmının peptit konsantrasyonu ve çeşitliliği açısından fraksiyonlara göre yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle üç hidrolizat ve out kısımları fraksiyonlardan ayrı olarak değerlendirilmelidir. Papain, bromelain, pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatları ve fraksiyonlamadaki out kısmının % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri Şekil 57'de gösterilmiştir.



Şekil 55. Papain, bromelain, pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı out fraksiyonlarının HA alanları



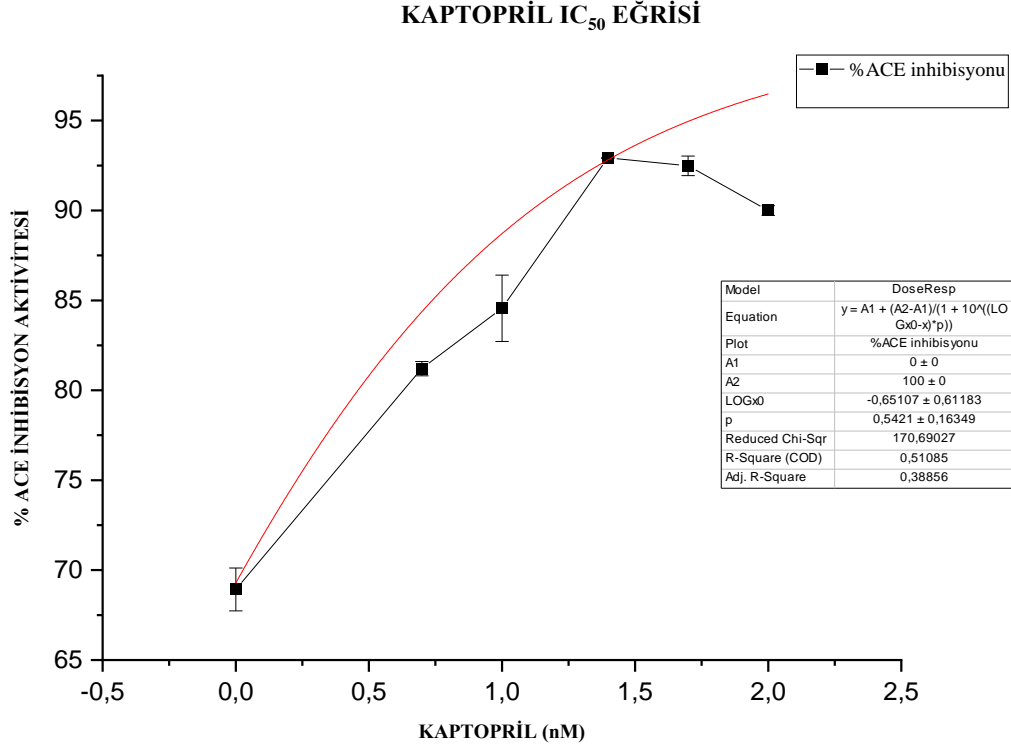
Şekil 56. Papain, bromelain, pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatları ve negatif kontrolün HA alanları.



Şekil 57. Papain, bromelain, pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatları ve fraksiyonlamadaki out kısmının %ACE inhibisyon aktivitesi değerleri

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 58’de gösterilmiştir. Çalışmada kaptopril için IC_{50} değeri 0.048 $\mu\text{g/ml}$ (0.22 nM) olarak hesaplanmıştır. Literatürdeki çalışmalarda kaptopril IC_{50} değeri 0.016 μM (Garza, vd., 2017), 0.022 μM (Li, vd., 2005) olarak bulunmuştur.



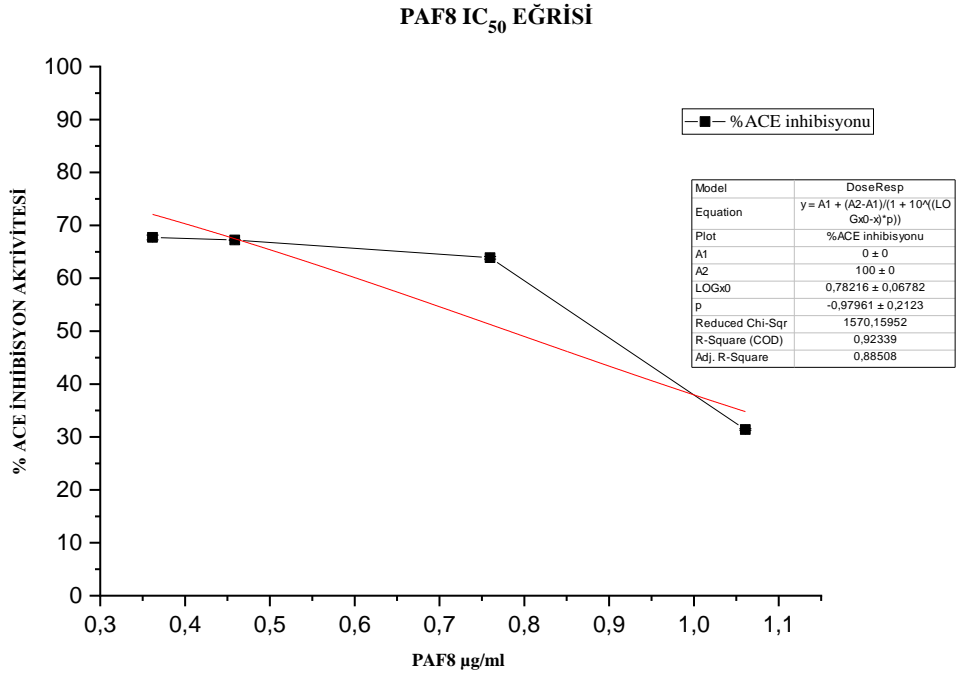
Şekil 58. Pozitif kontrol Kaptopril için IC₅₀ grafiği

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 ACE 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-inhibitör aktivitesinin etkinliği sentetik ilaçlarınkı kadar yüksek olmasa da farklı gıda proteinlerinden izole edilen birçok doğal ACE-inhibitör peptit, hipertansiyonun önlenmesinde ve hafif hipertansif bireylerin ilk tedavisinde uygulanabilir (Li, vd., 2008). ACE-inhibitörü biyoaktivitesinin araştırılması, biyoaktif peptitlerin literatüründe en sık çalışılan alanlardan biridir (Lee, vd., 2017). Bitki özleri, gıdadan türetilen ACE-inhibitör peptitler sentetik ilaçlara alternatif olarak kullanılmıştır

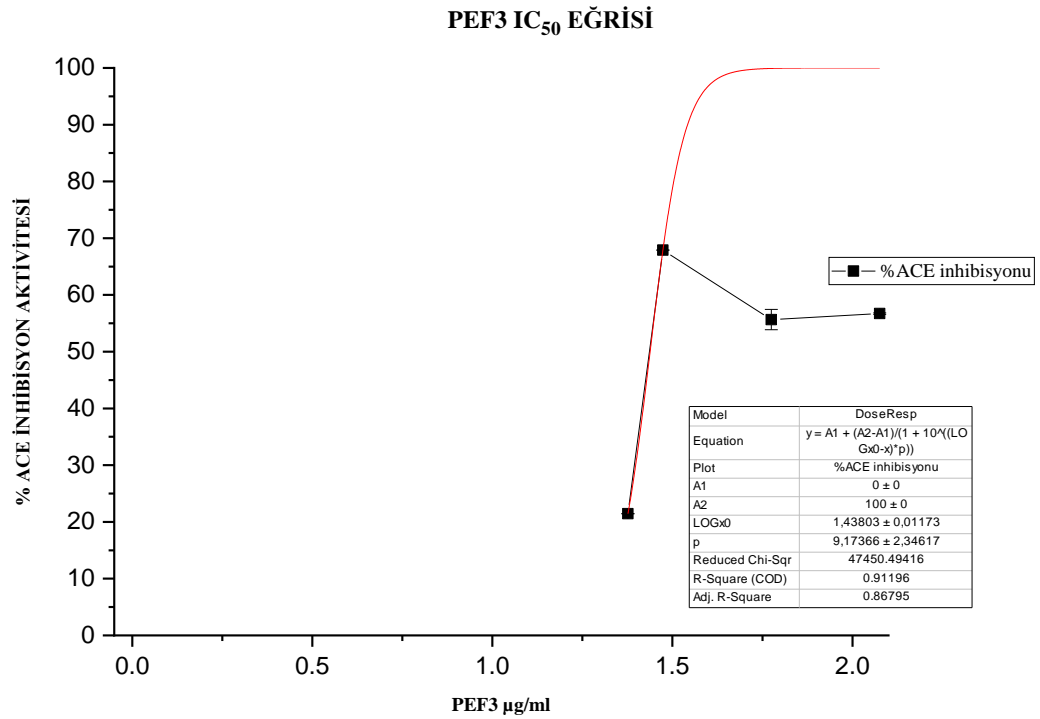
ve biyoaktif peptitlerin en iyi bilinen sınıfı olarak kabul edilmektedir (Jimsheena ve Gowda, 2011).

Çalışmada, sırasıyla en yüksek % ACE inhibisyon aktivitesi gösteren PEF3, BRF3, PAF8 ve PEF3 fraksiyonları için IC₅₀ grafikleri gösterilmiş ve kıyaslanmıştır (Şekil 59-63). PAF8 fraksiyonu için IC₅₀ değeri 6.05 µg/ml, BRF3 fraksiyonu için IC₅₀ değeri 20.79 µg/ml, PEF6 fraksiyonu için IC₅₀ değeri 1.97 µg/ml, PEF3 fraksiyonu için IC₅₀ değeri 27.42 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Şekil 21). Bitkisel kaynaklı proteinlere enzim uygulamasıyla oluşan ve sekansları belirlenen literatürdeki çalışmalarla benzer IC₅₀ değerleri bulunmuştur. Ceviz proteinlerine proteaz muamelesi ile elde edilen WPERPPQIP peptit sekansında IC₅₀ değeri 25.67 µg/ml olarak bulunmuştur (Liu, vd., 2013). Kanola proteinleri ile yapılan çalışmada alkalaz ile muamele sonucu elde edilen FL sekansına sahip peptide ait IC₅₀ değeri 1.33 µM olarak bulunmuştur (Wu ve Aluko, 2008). Kudret narı tohumu proteinine termolislin muamelesi sonucu oluşan VSGARY sekansına sahip peptide ait IC₅₀ değeri 8.64 µM olarak bulunmuştur (Priyanto, vd., 2015). Çalışmanın sonuçları literatürdeki bitkisel kaynaklı peptitler ile benzer sonuçlar göstermektedir. Çalışmada üç enzim ile üretilen hidrolizatlardan farklı peptitlerin oluşmasındaki en büyük neden enzimlerin yapısal ve işlevsel farklılığından kaynaklanmaktadır. 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 özgülüğü 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 papain, bromelain ve pepsin farklı özellikler göstermektedir.

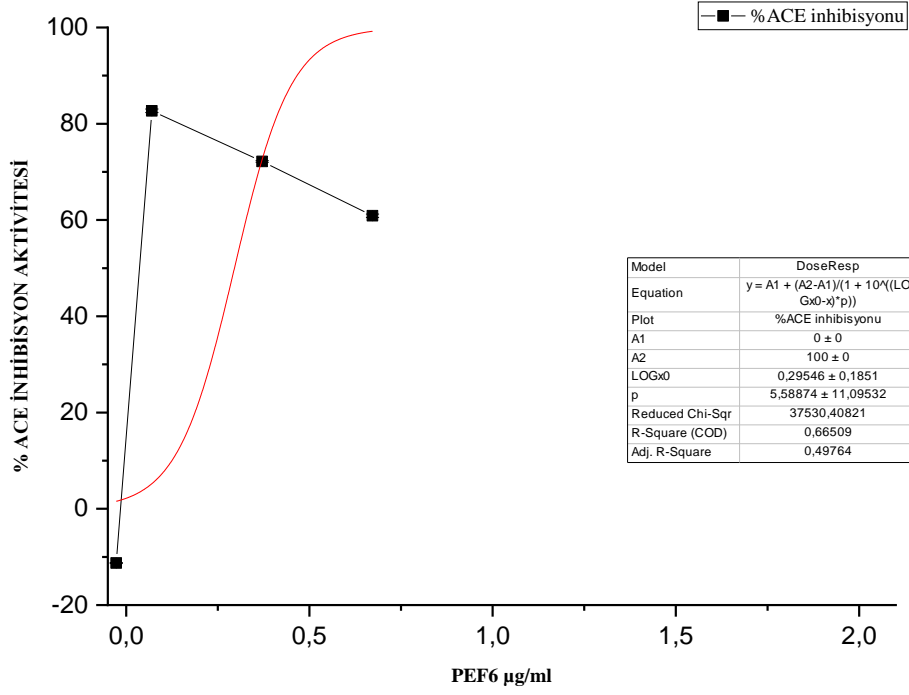


Şekil 59. PAF8 fraksiyonu için IC₅₀ grafiği



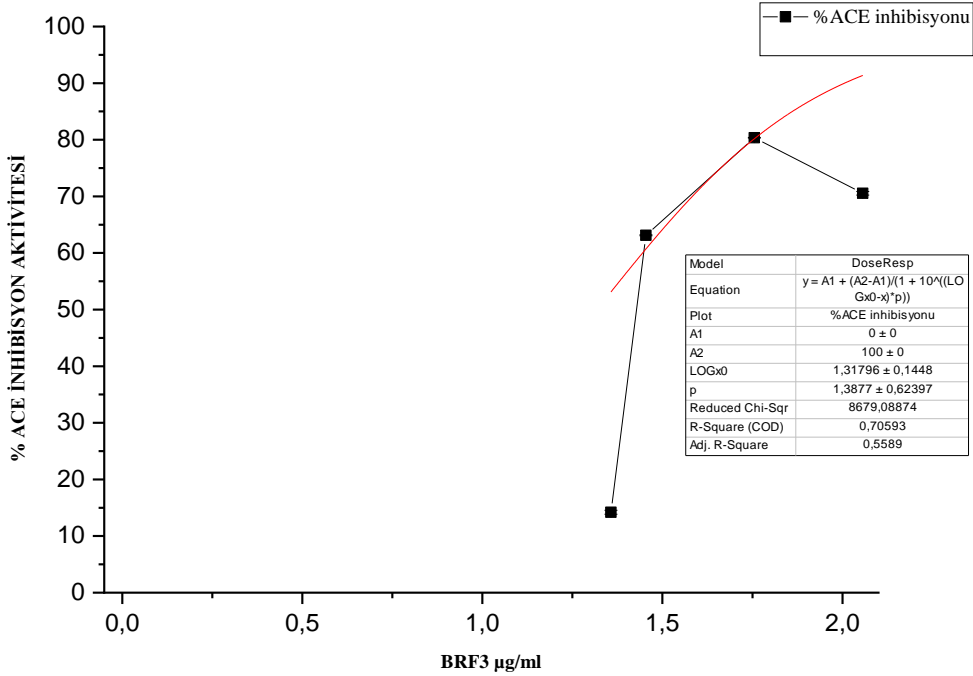
Şekil 60. PEF3 fraksiyonu için IC₅₀ grafiği

PEF6 IC₅₀ EĞRİSİ

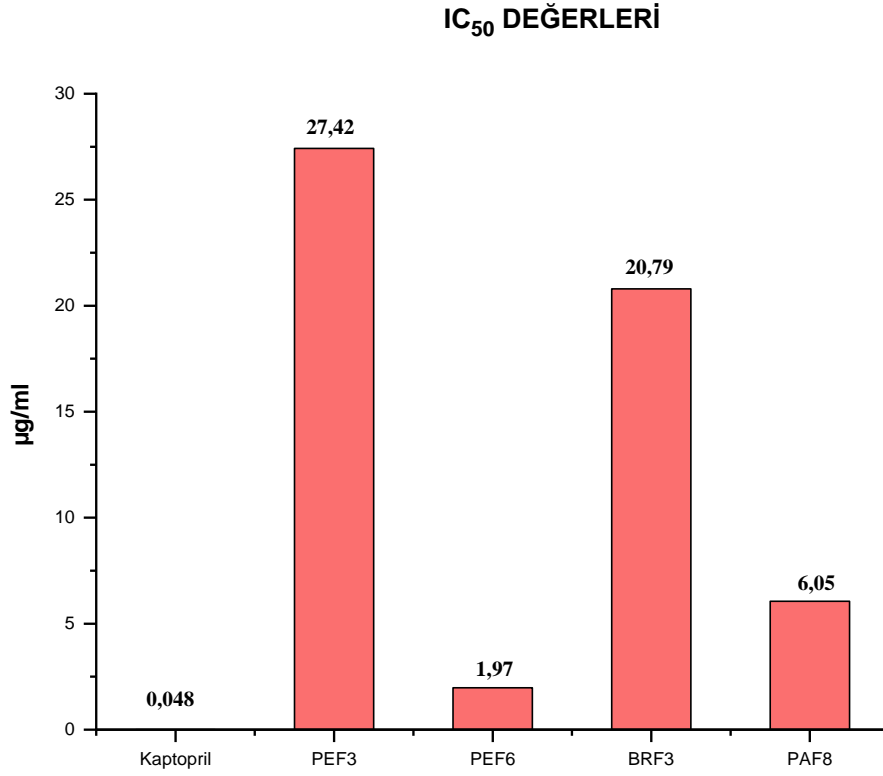


Şekil 61. PEF6 fraksiyonu için IC₅₀ grafiği

BRF3 IC₅₀ EĞRİSİ



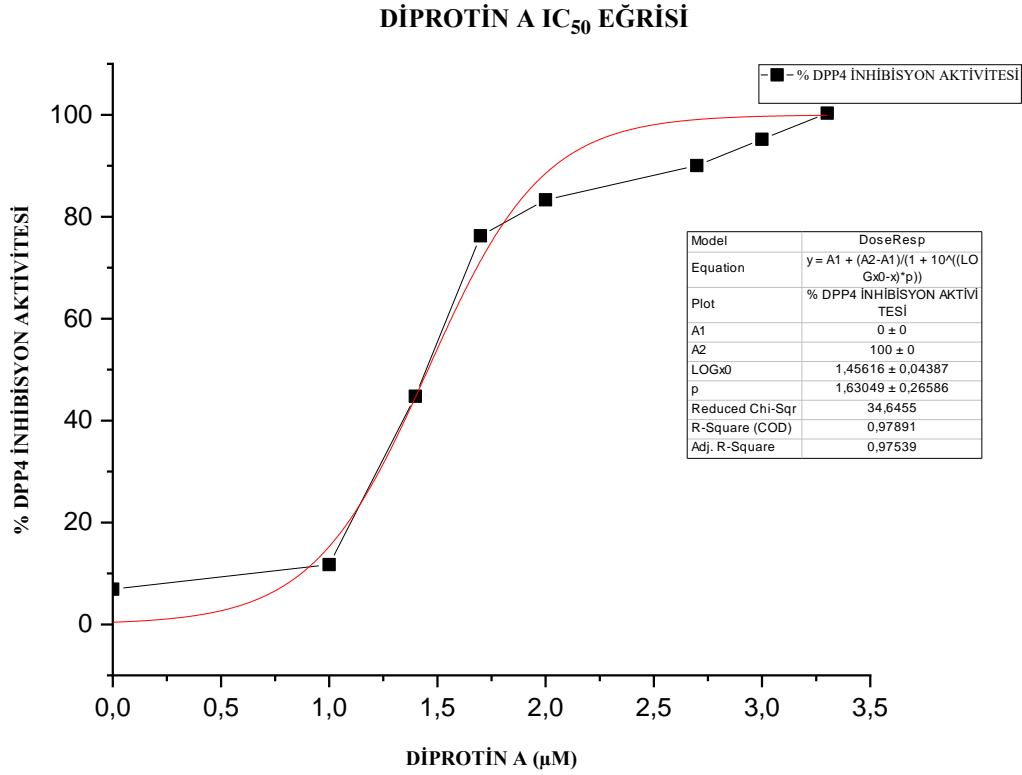
Şekil 62. BRF3 fraksiyonu için IC₅₀ grafiği



Şekil 63. En yüksek ACE-önleyici aktiviteye sahip fraksiyonlar

4.3.2. DPP-IV önleyici aktivite testi

Pozitif kontrol olan Diprotin A'dan 1-2000 µM arasında konsantrasyonlarda hazırlanarak IC₅₀ değeri hesaplanmıştır (Şekil 64). Diprotin A için IC₅₀ değeri 28.59 µM olarak bulunmuştur. Literatürdeki benzer çalışmalarda ton balığı pişirme suyu hidrolizatları peptitlerinde Diprotin A için IC₅₀ değeri 24.7 µM (Huang, vd., 2012), süt proteinleri peptitlerinde Diprotin A için IC₅₀ değeri 8.49 µM (Nongonierma, vd., 2013) ve 3.5 µM (Jia, vd., 2020) olarak bulunmuştur.



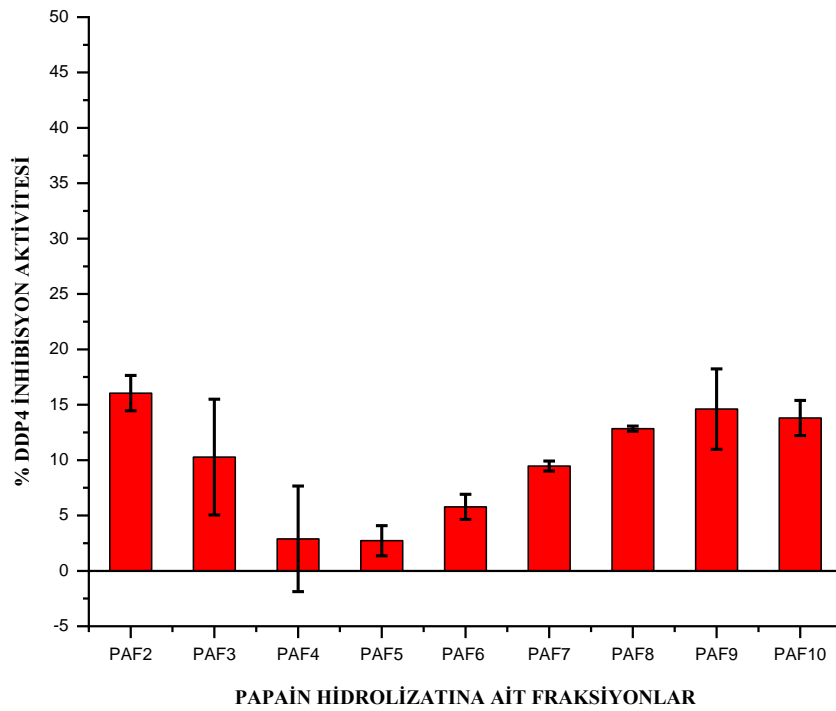
Şekil 64. Pozitif kontrol olan Diprotin A için IC₅₀ grafiği

Tablo 23 üzerinde papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPP4 inhibisyon aktivitesi değerleri verilmiştir. Hidrolizatın aktivite göstermediği ve out kısmının düşük aktivite gösterdiği görülmüştür. Fraksiyonların ise değişen oranlarda %DPP4 inhibisyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PAF2, PAF9 ve PAF10 göstermektedir (Şekil 65).

Tablo 23. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPP4 inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %DPP4 İnhibisyon Aktivitesi
Papain hidrolizatı	-
PA out tamamı	3,37±0,45
PA out fraksiyonu	3,85±2,04
PAF2	16,05±1,59
PAF3	10,27±5,22
PAF4	2,89±4,79

PAF5	2,73±1,36
PAF6	5,78±1,13
PAF7	9,47±0,45
PAF8	12,84±0,23
PAF9	14,61±3,63
PAF10	13,80±1,59

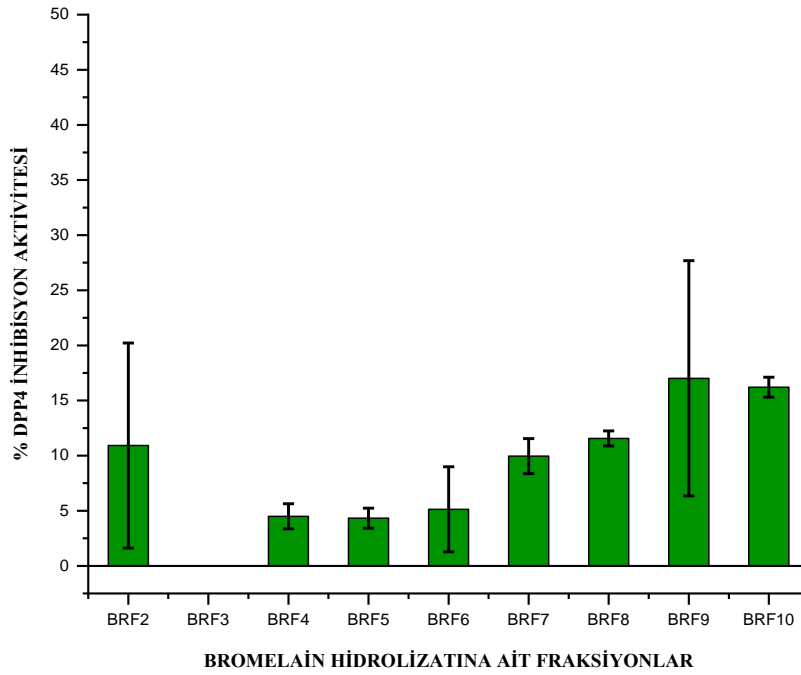


Şekil 65. Papain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % DPP4 inhibisyon aktivite değerleri.

Tablo 24 üzerinde bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPP4 inhibisyon aktivitesi değerleri verilmiştir. BRF3 fraksiyonunun aktivite göstermediği ve out kısmının düşük aktivite gösterdiği görülmüştür. Fraksiyonların ise değişen oranlarda %DPP4 inhibisyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla BRF9, BRF10 ve BRF8 göstermektedir (Şekil 66).

Tablo 24. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPP4 inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %DPP4 İnhibisyon Aktivitesi
Bromelain hidrolizatı	3,37±4,09
BR out tamamı	5,30±2,27
BR out fraksiyonu	0,48±0
BRF2	10,91±9,30
BRF3	-
BRF4	4,50±1,13
BRF5	4,33±0,91
BRF6	5,14±3,86
BRF7	9,95±1,59
BRF8	11,56±0,68
BRF9	17,01±10,67
BRF10	16,21±0,91

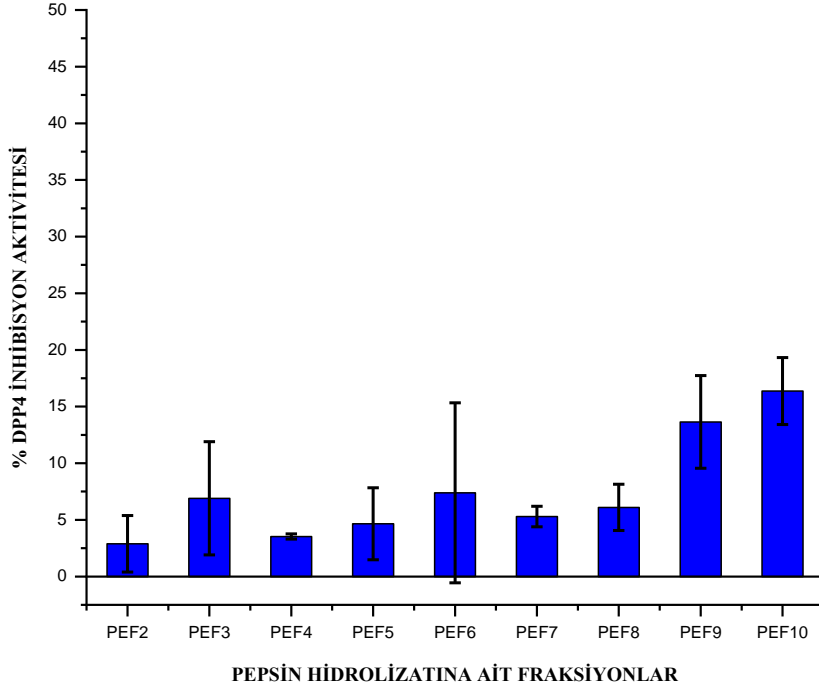


Şekil 66. Bromelain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % DPP4 inhibisyon aktivite değerleri

Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPP4 inhibisyon aktivitesi değerleri Tablo 25 üzerinden incelenebilmektedir. Fraksiyonların tamamı değişen oranlarda %DPP4 inhibisyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PEF10, PEF9 ve PEF3 göstermektedir (Şekil 67).

Tablo 25. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPP4 inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %DPPH Süpürme Aktivitesi
Pepsin hidrolizatı	33,39±0,30
PE out tamamı	22,04±0,31
PE out fraksiyonu	17,54±0,21
PEF2	25,57±0,34
PEF3	22,97±0,26
PEF4	24,17±0,30
PEF5	22,38±0,33
PEF6	42,75±0,68
PEF7	21,77±0,36
PEF8	35,46±0,55
PEF9	37,19±0,38
PEF10	55,80±0,60

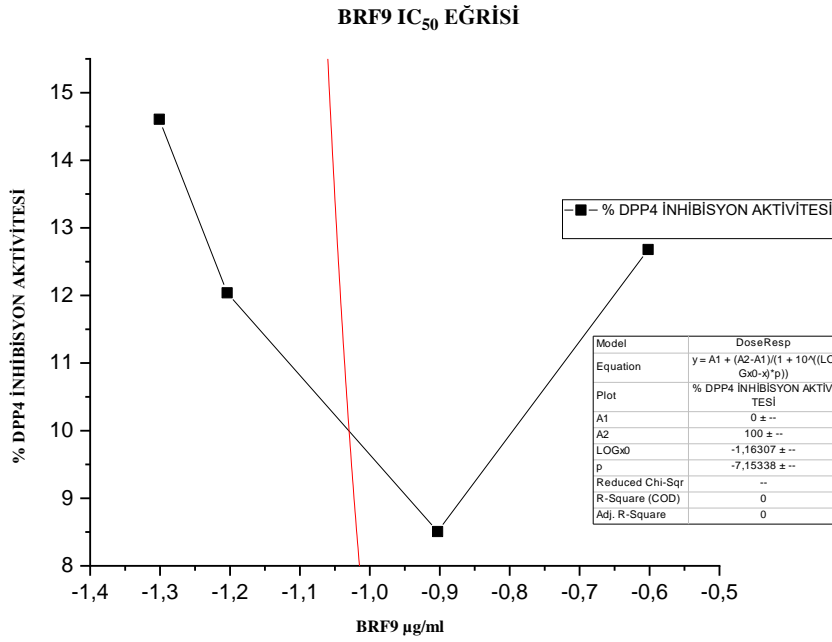


Şekil 67. Pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % DPP4 inhibisyon aktivite değerleri

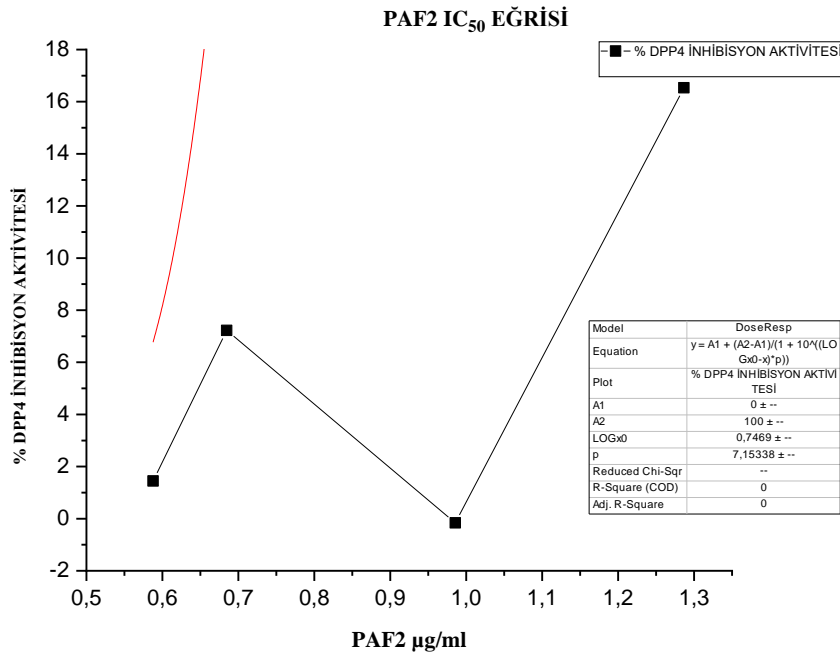
Çalışmada, sırasıyla en yüksek %DPP4 inhibisyon aktivitesi gösteren PAF2, BRF10, PEF10 fraksiyonlarıdır. PAF2 ve BRF10 fraksiyonları için IC_{50} grafikleri gösterilmiştir (Şekil 68-70). PAF2 fraksiyonu için IC_{50} değeri 5.58 $\mu\text{g/ml}$, BRF9 fraksiyonu için IC_{50} değeri 0.07 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Literatürdeki çalışmalarda acı bakla proteininden elde edilen LTFPGSAED peptid sekansının IC_{50} değeri 207.5 μM (Lammi, vd.,2018), fasulye proteininden elde edilen KTYGL peptid sekansının IC_{50} değeri 59.3 μM (Mojica, vd., 2017), buğday glutenininden elde edilen QPF sekanslı peptide ait IC_{50} değeri 71.7 μM (Taga, vd., 2017) olarak bulunmuştur.

Ton balığı pişirme suyu hidrolizatlarında 78 ile 116 μM arasında IC_{50} değerlerine sahip üç DPP-IV inhibe edici peptid tanımlanmıştır (Huang, vd., 2012). Bu peptitler, boyutları iki ila beş 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 dizisine bağlı olabileceğini öne sürmelerini sağlamıştır. Lacroix ve Li-Chan (2012) ayrıca, yüksek molekül ağırlıklı peptidlerde 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.

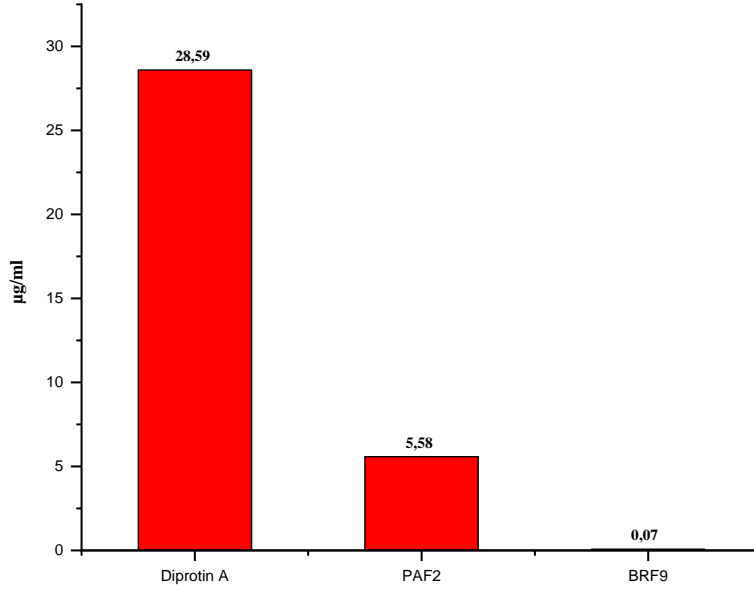


Şekil 68. BRF9 fraksiyonu için IC₅₀ grafiği



Şekil 69. PAF2 fraksiyonu için IC₅₀ grafiği

IC₅₀ DEĞERLERİ



Şekil 70. En yüksek DPP4-önleyici aktiviteye sahip fraksiyonların aktivitelerinin kıyaslanması.

4.3.3. Antioksidatif aktivite testleri

4.3.3.1. DPPH yöntemi

Tablo 26’da papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPPH süpürme aktivitesi değerleri verilmiştir. PAF9 fraksiyonunun aktivite göstermediği görülmüştür. Fraksiyonların ise değişen oranlarda %DPPH süpürme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PAF9, PAF8 ve PAF7 göstermektedir. Pozitif kontrol olan troloks için IC₅₀ 0,64 mg/ml ve BHT için IC₅₀ 0,06 mg/ml olarak bulunmuştur.

Tablo 26. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % DPPH süpürme aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %DPPH Süpürme Aktivitesi
Papain hidrolizatı	17,29±0,41
PA out tamamı	6,26±0,23
PA out fraksiyonu	1,56±0,08
PAF2	0,63±0,05

PAF3	3,32±0,11
PAF4	6,83±0,27
PAF5	7,88±0,2
PAF6	6,41±0,19
PAF7	36,07±0,64
PAF8	42,91±0,81
PAF9	44,43±0,86
PAF10	31,67±0,33

Tablo 27’de bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPPH süpürme aktivitesi değerleri verilmiştir. Fraksiyonların tamamı değişen oranlarda %DPPH süpürme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla BRF8, BRF2 ve BRF10 göstermektedir.

Tablo 27. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPPH süpürme aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %DPPH Süpürme Aktivitesi
Bromelain hidrolizatı	16,14±0,48
BR out tamamı	45,18±0,51
BR out fraksiyonu	44,69±0,73
BRF2	51,39±0,48
BRF3	21,63±0,36
BRF4	29,32±0,46
BRF5	17,87±0,28
BRF6	26,97±0,34
BRF7	34,83±0,3
BRF8	51,98±0,67
BRF9	41,17±0,27
BRF10	45,01±0,36

Tablo 28’de pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPPH süpürme aktivitesi değerleri verilmiştir. Fraksiyonların tamamı değişen oranlarda

%DPPH süpürme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PEF10, PEF6 ve PEF9 göstermektedir.

Tablo 28. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %DPP4 inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %DPPH Süpürme Aktivitesi
Pepsin hidrolizatı	33,39±0,3
PE out tamamı	22,04±0,31
PE out fraksiyonu	17,54±0,210,34
PEF2	25,57±0,26
PEF3	22,97±0,3
PEF4	24,17±0,33
PEF5	22,38±0,68
PEF6	42,75±0,36
PEF7	21,77±0,55
PEF8	35,46±0,38
PEF9	37,19±0,6
PEF10	55,80±

Çeşitli çalışmalar, peptitlerin antioksidan aktivitesinin moleküler ağırlık dağılımlarına bağımlılığını (Peña - Ramos, vd., 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 temizleme 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).

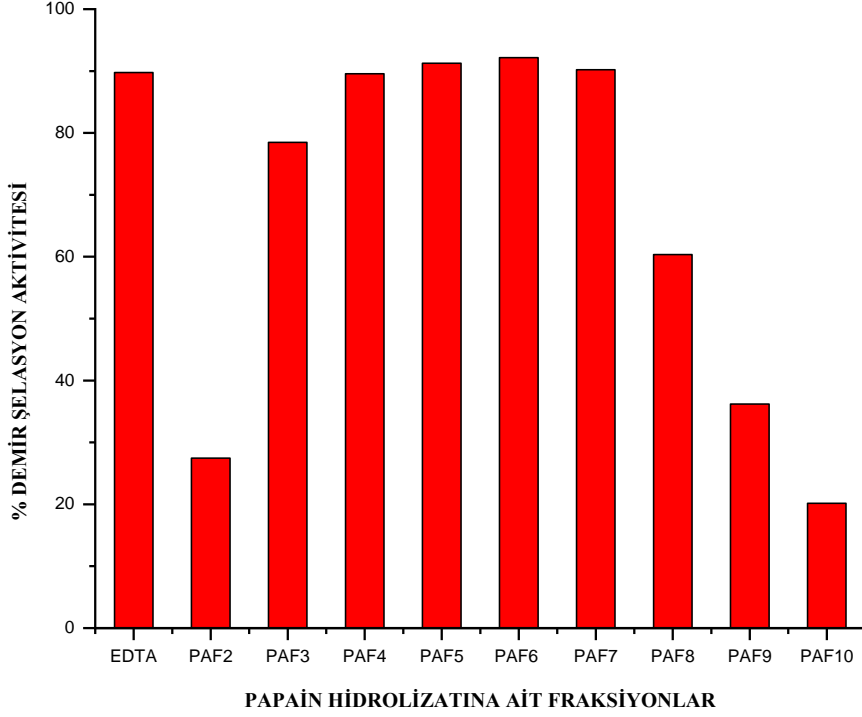
4.3.3.2. Demir şelasyon aktivitesi testi

Tablo 29'da papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %demir şelasyon aktivitesi değerleri verilmiştir. Hidrolizatın out fraksiyonunun aktivite göstermediği görülmüştür. Fraksiyonların ise değişen oranlarda %demir şelasyon aktivitesine

sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PAF3, PAF5 ve PAF2 göstermektedir (Şekil 71). Pozitif kontrol olan EDTA için IC₅₀ 0,06 mg/ml olarak bulunmuştur.

Tablo 29. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama demir şelasyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %Demir Şelasyon Aktivitesi
Papain hidrolizatı	53,18±0,001
PA out tamamı	0,13±0,002
PA out fraksiyonu	3,10±0,002
PAF2	49,28±0,002
PAF3	77,05±0,003
PAF4	41,59±0,001
PAF5	75,05±0,001
PAF6	41,69±0,001
PAF7	31,77±0,001
PAF8	21,51±0,002
PAF9	12,92±0,001
PAF10	10,31±0,003



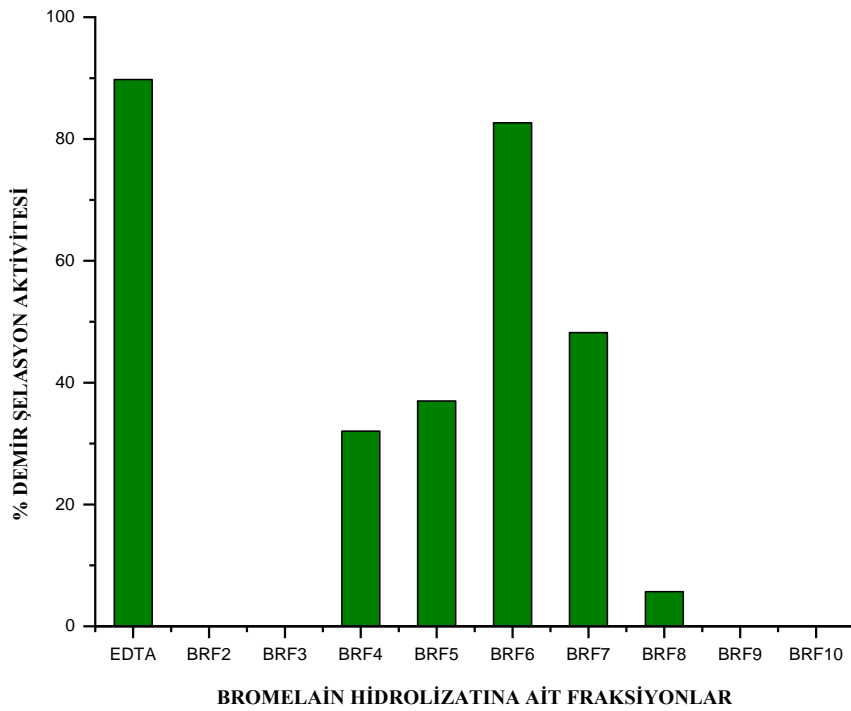
Şekil 71. Papain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % demir şelasyon aktivitesi.

Tablo 30’da bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %demir şelasyon aktivitesi değerleri verilmiştir. Fraksiyonlardan 5 tanesinin ve hidrolizatın aktivite göstermediği görülmüştür. Fraksiyonların ise değişen oranlarda %demir şelasyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla BRF6, BRF7 ve BRF5 göstermektedir (Şekil 72).

Tablo 30. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %demir şelasyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %Demir Şelasyon Aktivitesi
Bromelain hidrolizatı	-
BR out tamamı	-
BR out fraksiyonu	-
BRF2	-

BRF3	-
BRF4	12,13±0,001
BRF5	41,21±0,001
BRF6	36,95±0,001
BRF7	11,41±0,002
BRF8	44,36±0,001
BRF9	8,26±0,001
BRF10	8,56±0,002

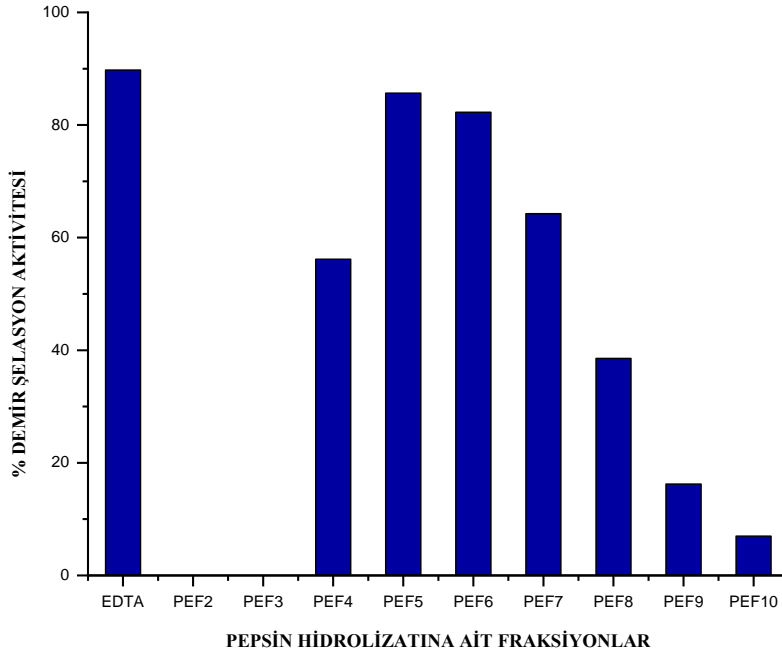


Şekil 72. Bromelain ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % demir şelasyon aktivitesi.

Tablo 31’de pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %demir şelasyon aktivitesi değerleri verilmiştir. Fraksiyonlardan 3 tanesinin ve hidrolizatın aktivite göstermediği görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PEF6, PEF5 ve PEF4 göstermektedir (Şekil 73).

Tablo 31. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizati ve fraksiyonlarına ait ortalama %demir şelasyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %Demir Şelasyon Aktivitesi
Pepsin hidrolizati	-
PE out tamamı	25,38±0,578
PE out fraksiyonu	-
PEF2	0,38±0,002
PEF3	-
PEF4	56,97±0,001
PEF5	65,59±0,001
PEF6	77,28±0,001
PEF7	51,26±0,001
PEF8	-
PEF9	28,74±0,001
PEF10	15,13±0,002
Pepsin hidrolizati	-
PE out tamamı	25,38±0,578
PE out fraksiyonu	-
PEF2	0,38±0,002
PEF3	-
PEF4	56,97±0,001
PEF5	65,59±0,001
PEF6	77,28±0,001
PEF7	51,26±0,001
PEF8	-
PEF9	28,74±0,001
PEF10	15,13±0,002



Şekil 73. Pepsin ile elde edilen fındık proteini hidrolizatı fraksiyonlarının % demir şelasyon aktivitesi

N terminalinde yüksek bir histidin içeriğine ve daha kısa uzunluğa sahip peptitlerin en yüksek metal iyonu şelatlama aktivitesini sergilediği gösterilmiştir. (Torres-Fuentes, vd., 2011).

4.3.3.3. FRAP yöntemi

Tablo 32-34'de papain, pepsin ve bromelain enzimleri ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % demir (III) iyonu indirgeyici aktivite değerleri verilmiştir. Papain fraksiyonlarından en yüksek aktiviteyi sırasıyla PAF4, PAF5 ve PAF3 göstermektedir.

Bu sonuçlar, bu çalışmada papain, bromelain ve pepsin enzimi ile proteolitik sindirim yoluyla üretilen fındık proteini 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, vd., 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).

Tablo 32. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % demir (III) iyonu indirgeyici aktivite değerleri

Örnek	Ortalama %Demir (III) İyonu İndirgeme Aktivitesi
Papain hidrolizatı	75,47±0,011
PA out tamamı	58,60±0,018
PA out fraksiyonu	69,41±0,018
PAF2	19,50±0,008
PAF3	52,47±0,002
PAF4	77,49±0,011
PAF5	62,80±0,004
PAF6	41,44±0,016
PAF7	15,31±0,011
PAF8	15,58±0,011
PAF9	17,46±0,022
PAF10	11,86±0,008

Bromelain fraksiyonlarından en yüksek aktiviteyi sırasıyla BRF4, BRF5 ve BRF6 göstermektedir. Fraksiyonların değişen oranlarda % demir (III) iyonu indirgeyici aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 33. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % demir(III) iyonu indirgeyici aktivite değerleri

Örnek	Ortalama % Demir (III) İyonu İndirgeme Aktivitesi
Bromelain hidrolizatı	53,15±0,012
BR out tamamı	12,75±0,016
BR out fraksiyonu	69,52±0,009
BRF2	4,41±0,004

BRF3	12,16±0,016
BRF4	31,76±0,004
BRF5	21,69±0,004
BRF6	17,20±0,004
BRF7	-
BRF8	4,06±0,021
BRF9	16,13±0,014
BRF10	15,86±0,015

Pepsin fraksiyonlarından sadece 3 tanesinin aktivite göstermediği görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PEF4, PEF3 ve PEF5 göstermektedir.

Tablo 34. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % demir(III) iyonu indirgeyici aktivite değerleri

Örnek	Ortalama % Demir (III) İyonu İndirgeme Aktivitesi
Pepsin hidrolizatı	52,55±0,007
PE out tamamı	56,16±0,018
PE out fraksiyonu	52,12±0,011
PEF2	23,98±0,010
PEF3	47,47±0,21
PEF4	50,19±0,003
PEF5	41,18±0,010
PEF6	31,76±0,004
PEF7	-
PEF8	7,80±0,020
PEF9	-
PEF10	-

4.3.3.4. Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi

Tablo 35-37'de papain, pepsin ve bromelain enzimleri ile elde edilen fındık hidrolizati ve fraksiyonlarına ait ortalama % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri verilmiştir. Fraksiyonlardan 2 tanesinin aktivite göstermediği grlmştir. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PAF3, PAF2 ve PAF8 göstermektedir. Pozitif kontrol olan troloks için IC50 0,9 mg/ml olarak bulunmuştur.

Tablo 35. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizati ve fraksiyonlarına ait ortalama % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri

rnek	Ortalama %hidroksil radikali tutma Aktivitesi
Papain hidrolizati	-
PA out tamamı	15,09±0,006
PA out fraksiyonu	0,93±0,004
PAF2	50,51±0,001
PAF3	59,49±0,002
PAF4	1,48±0,009
PAF5	-
PAF6	15,18±0,003
PAF7	10,27±0,004
PAF8	22,32±0,004
PAF9	21,87±0,001
PAF10	-

Udenigwe ve Aluko (2011), peptitlerdeki hidrofobik amino asit kalıntılarının peptitlerin H₂O₂ süpürücü ozellikleri üzerinde pozitif etkilere sahip olduğunu, diğer yandan pozitif yüklü kalıntılarının bir peptidin hidrojen peroksiti süpürme yeteneğini olumsuz etkilediğini ne sürmüşlerdir. Ayrıca Li ve Li (2013), bir peptidin C-terminal amino asit kalıntısının, bir peptidin antioksidan aktivitesi için en önemli alan olduğunu göstermiştir.

Tablo 36'da bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizati ve fraksiyonlarına ait ortalama %hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri verilmiştir. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi

sırasıyla BRF9, BRF4 ve BRF3 göstermektedir. Fraksiyonlardan 4 tanesinin aktivite göstermediği görülmüştür.

Tablo 36. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % hidroksil radikali tutma Aktivitesi
Bromelain hidrolizatı	-
BR out tamamı	-
BR out fraksiyonu	-
BRF2	-
BRF3	14,16±0,004
BRF4	14,37±0,001
BRF5	-
BRF6	7,74±0,001
BRF7	-
BRF8	4,40±0,003
BRF9	24,67±0,002
BRF10	-

Tablo 37’de pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri verilmiştir. Fraksiyonlardan 6 tanesinin aktivite göstermediği görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi PEF8 göstermektedir.

Tablo 37. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % hidroksil radikali tutma Aktivitesi
Pepsin hidrolizatı	-
PE out tamamı	-
PE out fraksiyonu	0,84±0,004
PEF2	-
PEF3	0,12±0,001

PEF4	7,26±0,004
PEF5	-
PEF6	-
PEF7	-
PEF8	17,83±0,003
PEF9	-
PEF10	-

4.3.3.5. ABTS yöntemi

Tablo 38-40 üzerinde papain, pepsin ve bromelain enzimleri ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ABTS süpürme aktivitesi değerleri verilmiştir. Tablo 38’de papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %ABTS süpürme aktivitesi değerleri verilmiştir. Fraksiyonların değişen oranlarda %ABTS süpürme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PAF4, PAF5 ve PAF3 göstermektedir.

Tablo 38. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ABTS süpürme aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % ABTS Süpürme Aktivitesi
Papain hidrolizatı	77,57±0,009
PA out tamamı	57,25±0,013
PA out fraksiyonu	46,72±0,014
PAF2	21,06±0,004
PAF3	28,04±0,008
PAF4	41,96±0,010
PAF5	31,11±0,009
PAF6	20,26±0,005
PAF7	16,88±0,003
PAF8	13,07±0,004
PAF9	14,71±0,001
PAF10	14,55±0,004

Tablo 39’da bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %ABTS süpürme aktivitesi değerleri verilmiştir. Fraksiyonların değişen oranlarda %ABTS süpürme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla BRF4, BRF5 ve BRF3 göstermektedir.

Tablo 39. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ABTS süpürme aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % ABTS Süpürme Aktivitesi
Bromelain hidrolizatı	50,21±0,014
BR out tamamı	19,68±0,006
BR out fraksiyonu	32,49±0,013
BRF2	16,40±0,008
BRF3	17,99±0,004
BRF4	24,55±0,006
BRF5	18,31±0,004
BRF6	14,97±0,005
BRF7	14,13±0,006
BRF8	15,03±0,006
BRF9	14,55±0,006
BRF10	12,22±0,008

Tablo 40 üzerinde pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ABTS süpürme aktivitesi değerleri verilmiştir. Fraksiyonların değişen oranlarda %ABTS süpürme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PEF4, PEF3 ve PEF2 göstermektedir.

Tablo 40. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ABTS süpürme aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % ABTS Süpürme Aktivitesi
Pepsin hidrolizatı	80,74±0,007
PE out tamamı	65,08±0,018

PE out fraksiyonu	51,64±0,019
PEF2	33,12±0,010
PEF3	46,51±0,019
PEF4	56,98±0,021
PEF5	28,15±0,013
PEF6	19,15±0,008
PEF7	17,83±0,004
PEF8	18,78±0,003
PEF9	18,78±0,004
PEF10	18,31±0,003

4.3.3.6. Superoksit anyon tutma aktivitesi

Tablo 41’de papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri verilmiştir. Fraksiyonların 8 tanesinin %superoksit anyon tutma aktivitesi sahip olmadığı görülmüştür. Fraksiyonlardan aktivite EN yüksek aktivite gösteren PAF2 fraksiyonudur.

Tablo 41. Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %Superoksit Anyon Tutma Aktivitesi
Papain hidrolizatı	27,46±0,16
PA out tamamı	23,74±0,18
PA out fraksiyonu	12,98±0,23
PAF2	20,41±0,23
PAF3	-
PAF4	-
PAF5	-
PAF6	-
PAF7	-
PAF8	-

PAF9	-
PAF10	-

Tablo 42’de bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri verilmiştir. Fraksiyonlardan 6 tanesinin ve hidrolizatın aktivite göstermediği görülmüştür. Fraksiyonların ise değişen oranlarda %superoksit anyon tutma aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Dolayısıyla enzimatik hidroliz etkinliği artırma potansiyeli taşımaktadır. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi BRF3 göstermektedir.

Tablo 42. Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri

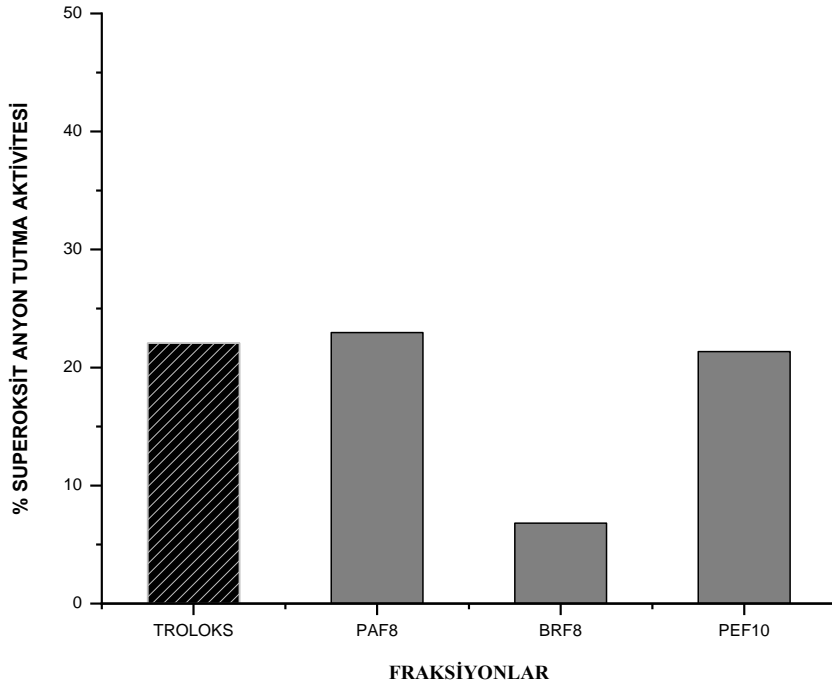
Örnek	Ortalama %Superoksit Anyon Tutma Aktivitesi
Bromelain hidrolizatı	18,63±0,19
BR out tamamı	10,00±0,22
BR out fraksiyonu	18,09±0,20
BRF2	21,15±0,22
BRF3	23,69±0,21
BRF4	0,14±0,27
BRF5	-
BRF6	-
BRF7	-
BRF8	-
BRF9	-
BRF10	-

Tablo 43 üzerinde pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri verilmiştir. Fraksiyonların 8 tanesinin %superoksit anyon tutma aktivitesi sahip olmadığı görülmüştür. Fraksiyonlardan aktivite EN yüksek aktivite gösteren PAF2 fraksiyonudur.

Tablo 43. Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama %superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %Superoksit Anyon Tutma Aktivitesi
Pepsin hidrolizatı	36,45±0,16
PE out tamamı	17,46±0,21
PE out fraksiyonu	18,74±0,18
PEF2	24,13±0,18
PEF3	40,22±0,60
PEF4	-
PEF5	-
PEF6	-
PEF7	1,53±0,30
PEF8	3,06±0,32
PEF9	2,73±0,29
PEF10	-

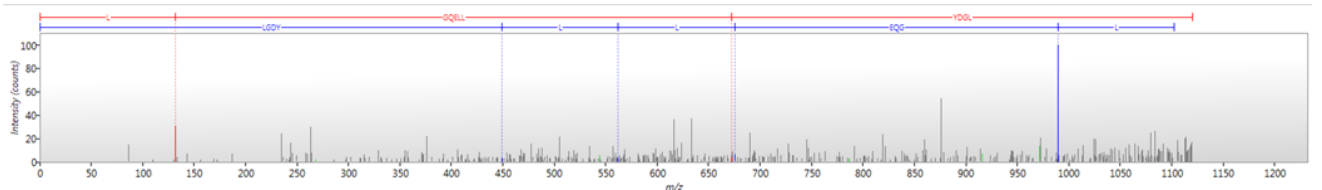
Şekil 74 üzerinde en yüksek %superoksit anyon tutma kapasitesine sahip fraksiyonlar ve pozitif kontrol olan troloksa ait grafik gösterilmiştir.



Şekil 74. Troloks ve fraksiyonlara ait %superoksit anyon tutma değerleri

4.3.4 ACE aktif fraksiyonların LC/MS-MS analizi ve özelliklerinin değerlendirilmesi

Önceki bölümlerde tarif edildiği üzere ACE aktivitesi gösteren fraksiyonlar toplanarak uygun **LC/MS-MS analiz** teknikleriyle incelenmiştir. Bu bağlamda elde edilen bazı örnek spektrumlar aşağıda sunulmaktadır (Şekil 75). Ekibimizin elinde şu anda ACE aktif fraksiyonlarda bulunmuş **83 farklı peptit spektrumu** bulunduğu için sadece örnek bir sunum yapılacaktır. Analiz tekniğinin detayları da aşağıda sunulmaktadır. Yöntem, DPP-IV aktif fraksiyonlar için de benzer şekilde uygulanmıştır.



Şekil 75. PAF-3 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum LGDYLLLEQGL peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.

LC/MS-MS Analizi sonucunda ilgili veri tabanları ile karşılaştırmalar yapılarak numunelerde bulunan peptitlerin dizilimleri (sekansları), moleküler ağırlıkları belirlenmiştir (Tablo 44-46). 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, 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. (2008) 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.

Tablo 44-46 üzerinden incelenebileceği gibi 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 anlaşılabilirliği gibi, bu peptitlerle ilgili bir literatür bulunmamaktadır. Buna ek olarak, şu aşamada elde edilen bazı sinyaller veri tabanlarında olan proteinlerle eşleşmemiştir. Dolayısıyla bulgularımızın bir kısmı yeni protein ve peptit ürünlerine işaret etmektedir. Grubumuzun bu bağlamda patent başvurusu hazırlığı hâlihazırda devam etmektedir. Bu konu ile ilgili verilerin değerlendirilmesi çalışmaları da benzer şekilde sürdürülmektedir. ACE aktif fraksiyonlardan analizi tamamlanmış 83 farklı peptit bulunmaktadır. Bu peptitlerle ilgili değerlendirmeler aşağıdaki üç tabloda (her biri sırasıyla pepsin, papain ve bromelain muameleleri ile ilgili olan) özetlenmiştir.

Tablo 44. LC/MS-MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda peptik ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristیکlerinin belirlenmesi.

No	Fraction Number	Sequence	Molecular Weight (g/mol)	pI	Toxicity	Peptide Ranker	Activity (BIOPEP)
1	BR-OUT	FFPQPNK	953,21	9,11	Non-Toxin	0,925382	ACE inhibitor
2	BR-OUT	LSVPNLYVWLCMFY	1748,34	5,84	Non-Toxin	0,917193	ACE inhibitor
3	BR-OUT	LILVSFSLCLLVLFNGCLG	2024,86	5,82	Non-Toxin	0,912876	ACE inhibitor
4	BR-OUT	DWWNAK	818,96	6,19	Non-Toxin	0,812221	dipeptidyl peptidase IV inhibitor
5	BR-OUT	FEWVAFK	926,17	6,35	Non-Toxin	0,739452	ACE inhibitor
6	BR-OUT	NSRFPLAG	861,07	10,11	Non-Toxin	0,695255	ACE inhibitor
7	BR-OUT	FPCLRNGIPK	1144,54	9,55	Non-Toxin	0,685234	ACE inhibitor
8	BR-OUT	WMVRHIYFCLRNG	1792,36	9,55	Non-Toxin	0,671061	ACE inhibitor
9	BR-OUT	VPHWNLNA	950,18	7,1	Non-Toxin	0,567019	ACE inhibitor
10	BR-OUT & BRF-2	LYVPHWNLNA	1226,55	7,09	Non-Toxin	0,498095	ACE inhibitor
11	BR-OUT	LQNKFRNSMVG	1293,67	11,01	Non-Toxin	0,428146	ACE inhibitor
12	BR-OUT	ESSGPINLLHK	1194,52	7,1	Non-Toxin	0,378602	ACE inhibitor
13	BR-OUT & BRF-2	NQLDENPRHFY	1432,67	5,33	Non-Toxin	0,359851	ACE inhibitor
14	BRF-5	QIESWDHNDQQFQCAG	1906,21	4,03	Non-Toxin	0,337483	ACE inhibitor
15	BR-OUT	CIRKSWVVRQLVK	1615,21	11,02	Non-Toxin	0,33498	ACE inhibitor
16	BR-OUT	FQISREEARRLK	1532,93	10,75	Non-Toxin	0,333562	ACE inhibitor
17	BRF-2	NNVFSGFDA	970,12	3,8	Non-Toxin	0,318472	ACE inhibitor
18	BR-Out	TLLVFDEVQCGLG	1393,82	3,67	Non-Toxin	0,298879	ACE inhibitor
19	BR-OUT	QQQFGQRRRQQQHSRG	2025,43	12,48	Non-Toxin	0,294031	ACE inhibitor
20	BR-OUT	ELLRFGDREFY	1444,76	4,68	Non-Toxin	0,258676	ACE inhibitor

21	BR-OUT	DSPVVAVSLHTNNY	1629,02	5,09	Non-Toxin	0,252972	ACE inhibitor
22	BR-OUT	LPDDVLANA	927,14	3,57	Non-Toxin	0,245785	ACE inhibitor
23	BR-OUT & BRF-2	IRALPDDVLA	1082,4	4,21	Non-Toxin	0,228586	ACE inhibitor
24	BR-OUT	ILNSLI	671,93	5,88	Non-Toxin	0,214961	ACE inhibitor
25	BR-OUT	QVLTIPQNFA	1130,46	5,88	Non-Toxin	0,204557	ACE inhibitor
26	BRF-5	EDRRTDFA	1009,13	4,56	Non-Toxin	0,20263	ACE inhibitor
27	BR-OUT	QVLTIPQNFAVA	1300,7	5,88	Non-Toxin	0,190895	ACE inhibitor
28	BRF-5	MAISDMPESTG	1138,42	3,67	Non-Toxin	0,186099	ACE inhibitor
29	BR-OUT	VIRRTIEPNGLLLPQY	1882,49	9,1	Non-Toxin	0,166933	ACE inhibitor
30	BR-Out	FQRFTRPDEKQPA	1619,97	9,1	Non-Toxin	0,166096	ACE inhibitor
31	BR-Out	TLLVFDEVQCG	1223,57	3,67	Non-Toxin	0,162137	ACE inhibitor
32	BR-OUT	MINRDENEKLFIVK	1749,27	6,53	Non-Toxin	0,161584	ACE inhibitor
33	BR-OUT	ILNSLIS	759,02	5,88	Non-Toxin	0,151496	ACE inhibitor
34	BR-Out	NSHVREVRGVG	1209,49	9,95	Non-Toxin	0,145148	ACE inhibitor
35	BRF-5	CPETFEDPQQSQQG	1721,99	3,58	Non-Toxin	0,141302	ACE inhibitor
36	BR-Out	DSDWLRAVTEQA	1390,63	4,03	Non-Toxin	0,13593	ACE inhibitor
37	BR-OUT	RVQVLENFTK	1233,58	9,1	Non-Toxin	0,129468	ACE inhibitor
38	BR-OUT	TNDNAQISPLA	1143,37	3,8	Non-Toxin	0,127024	ACE inhibitor
39	BR-OUT	VFQDEHFESRVKTEEG	1937,28	4,58	Non-Toxin	0,119598	ACE inhibitor
40	BR-OUT	CRDERQFDEQRRDG	1938,22	4,87	Non-Toxin	0,117736	ACE inhibitor
41	BR-OUT	VSLHTNNYA	1131,4	7,09	Non-Toxin	0,108661	ACE inhibitor
42	BR-OUT	NAFQISREEA	1164,37	4,54	Non-Toxin	0,100615	ACE inhibitor
43	BR-Out	TLTHVSNVfy	1180,47	7,09	Non-Toxin	0,0985137	ACE inhibitor
44	BR-Out	NVEVQAPSSVK	1157,44	6,35	Non-Toxin	0,0885316	ACE inhibitor
45	BRF-2	LEPTNRIEA	1042,28	4,54	Non-Toxin	0,0861929	ACE inhibitor
46	BR-OUT	TEEGRVQVLENFTK	1650,03	4,79	Non-Toxin	0,0756939	ACE inhibitor
47	BR-OUT	RVQVDDNGNTVFDDELROG	2276,7	4,04	Non-Toxin	0,074535	ACE inhibitor
48	BR-OUT	RARVQVDDNG	1228,48	6,31	Non-Toxin	0,0647287	ACE inhibitor

49	BR-OUT	NSVRESVRVRDSSTDESLA	2107,47	4,79	Non-Toxin	0,058533	ACE inhibitor
----	--------	---------------------	---------	------	-----------	----------	---------------

Tablo 45. LC/MS-MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile oluşan ACE aktif findık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

No	Fraction Number	Sequence	Molecular Weight (g/mol)	pI	Toxicity	Peptide Ranker	Activity (BIOPEP)
50	PAF 3 & PAF 4	NSMVGNMIFWFFCILGQPMCVLLYYHDLNMR	3905,22	7,03	Non-Toxin	0,925937	ACE inhibitor
51	PAF-OUT	SEGFVWVAFK	1199,46	4,54	Non-Toxin	0,66673	ACE inhibitor
52	PAF-OUT	AESEGFVWVAFK	1399,68	4,26	Non-Toxin	0,497879	ACE inhibitor
53	PAF 3	ESPLSSDAIFR	1221,47	4,38	Non-Toxin	0,466547	ACE inhibitor
54	PAF-OUT	QGQQQFGQR	1076,28	10,1	Non-Toxin	0,422902	ACE inhibitor
55	PAF 3	LGDYLLLEQGL	1120,43	3,67	Non-Toxin	0,415663	ACE inhibitor
56	PAF 3	DFDEPGHLAPT	1198,4	4,03	Non-Toxin	0,405327	ACE inhibitor
57	PA-2	MGPTFGAMMISGQK	1455,98	9,11	Non-Toxin	0,400828	ACE inhibitor
58	PAF2	DENEKLFIVK	1234,56	4,68	Non-Toxin	0,230645	ACE inhibitor
59	PAF-OUT	ADIYTEQVGR	1151,38	4,38	Non-Toxin	0,222525	ACE inhibitor
60	PA- Out	STSKDAQALIQSLR	1517,9	9,1	Non-Toxin	0,215668	ACE inhibitor
61	PAF2	ESFNVEHGDIIR	1415,7	4,66	Non-Toxin	0,195203	ACE inhibitor
62	PA-2	YNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIK	2540,18	4,41	Non-Toxin	0,183816	ACE inhibitor
63	PA- Out	IQVNKENKEFK	1376,74	8,84	Non-Toxin	0,177555	ACE inhibitor
64	PAF-OUT	INTVNSNTLPVLR	1440,86	10,11	Non-Toxin	0,163209	ACE inhibitor
65	PAF-OUT	RLQSNQDK	988,18	9,1	Non-Toxin	0,086066	ACE inhibitor
66	PAF 4 & 5	AISDMPESTGTTATTATMPHGGSDLR	2606,2	4,54	Non-Toxin	0,0457757	ACE inhibitor
67	PAF-OUT	TVDATQSTK	950,13	6,19	Non-Toxin	0,0405488	ACE inhibitor
68	PAF-OUT	NKTTDVAQSAK	1162,41	8,94	Non-Toxin	0,0404001	ACE inhibitor
69	PAF 6	DTDILAAFRVTPQPGVPPEEAGAAVAAESSTGTWTTVWTDGLTSLDR	4859,97	3,9	Non-Toxin	0,0072604	ACE inhibitor

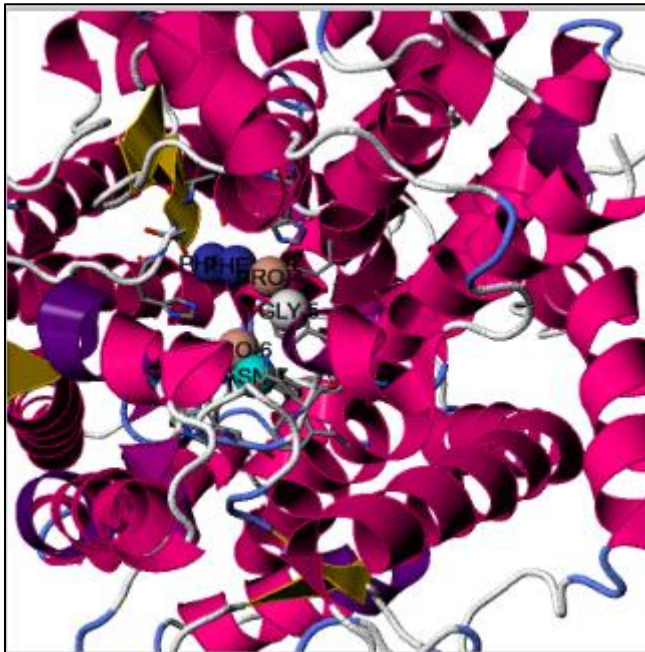
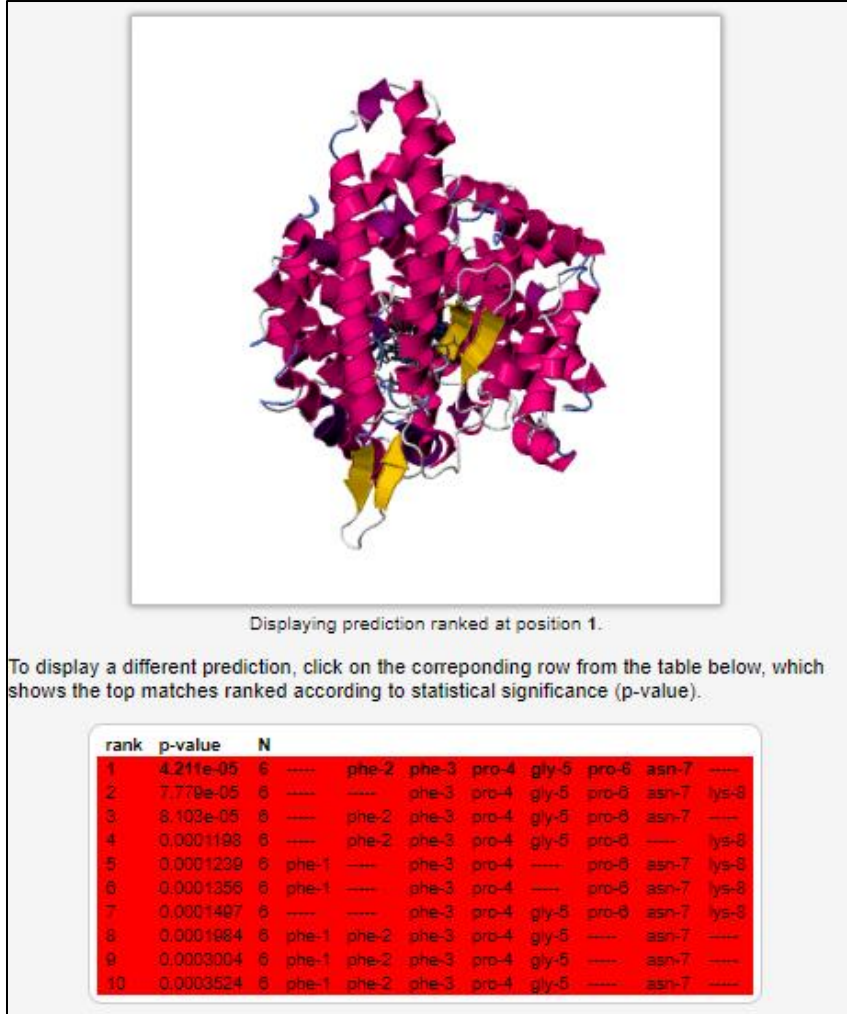
Tablo 46. LC/MS-MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda bromelain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

No	Fraction Number	Sequence	Molecular Weight (g/mol)	pI	Toxicity	Peptide Ranker	Activity (BIOPEP)
70	PEF3 & PE-2	FMRWRDRFL	1326,7	11,7	Non-Toxin	0,935626	ACE inhibitor
71	PEF-2	FEDPQQSQQGQGGQSQRSEQDRHQKIRY	3603,23	7,11	Non-Toxin	0,817196	ACE inhibitor
72	PEF-2	FEDPQQSQQGQRQGGQSQRSEQDRHQKIRHFREGDIIA	4763,69	7,27	Non-Toxin	0,745295	ACE inhibitor
73	PEF-2	LDENPRHF	1027,21	5,33	Non-Toxin	0,581565	ACE inhibitor
74	PEF6 & PE-2	FGGGTLGHP	842,06	7,1	Non-Toxin	0,562428	ACE inhibitor
75	PEF-2	WNLNAHSVV	1039,29	7,1	Non-Toxin	0,200479	ACE inhibitor
76	PEF-2	FAVAKRAESEGF	1440,74	4,79	Non-Toxin	0,188218	ACE inhibitor
77	PEF-4	FEETICS	827,99	3,8	Non-Toxin	0,165987	dipeptidyl peptidase IV inhibitor
78	PEF2 - PE-2	FTANTSLAH	961,16	7,1	Non-Toxin	0,153651	ACE inhibitor
79	PEF-4	YNDGDSPVAVS	1222,43	3,57	Non-Toxin	0,116679	ACE inhibitor
80	PEF5 & PE-2	SPQTETKASVG	1104,33	6,35	Non-Toxin	0,0970492	ACE inhibitor
81	PE-2	MSPQTETKASVG	1235,54	6,35	Non-Toxin	0,0909065	ACE inhibitor
82	PEF-2	LNAHSVV	738,94	7,1	Non-Toxin	0,0776572	ACE inhibitor

83	PE-3	YVKDRVDEVDHTN	1589,86	4,66	Non-Toxin	0,0499048	ACE inhibitor
----	------	---------------	---------	------	-----------	-----------	---------------

Bu değerlendirmeler sonucunda, aktif fraksiyonlarının tamamına yakınında hem aktif, hem de aktif olmayan peptitlerin bulunduğu anlaşılmıştır. Mooney vd. (2012) referansına göre (Peptide Ranker) peptitlerin muhtemel biyoaktiviteleri sıralanmıştır. Bunun yanında, Minkiewicz vd. (2008) referansına göre, peptitlerin (eğer varsa) ACE inhibisyon potansiyelleri incelenmiştir. Bu bağlamda hem *in vitro* ACE aktivitesi bulgularanan, hem de bu aktiviteleri *in silico* tekniklerce doğrulananan peptitlerin ACE inhibisyon mekanizması incelenmiştir (Trabuco vd. 2012 – PepSite2). Bu bağlamda aşığıdaki şekil ve tablolarda 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.

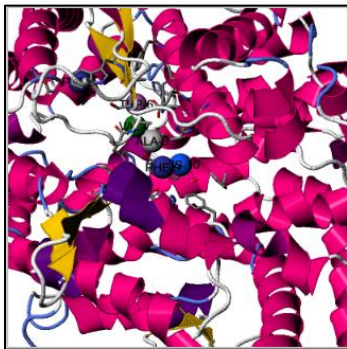
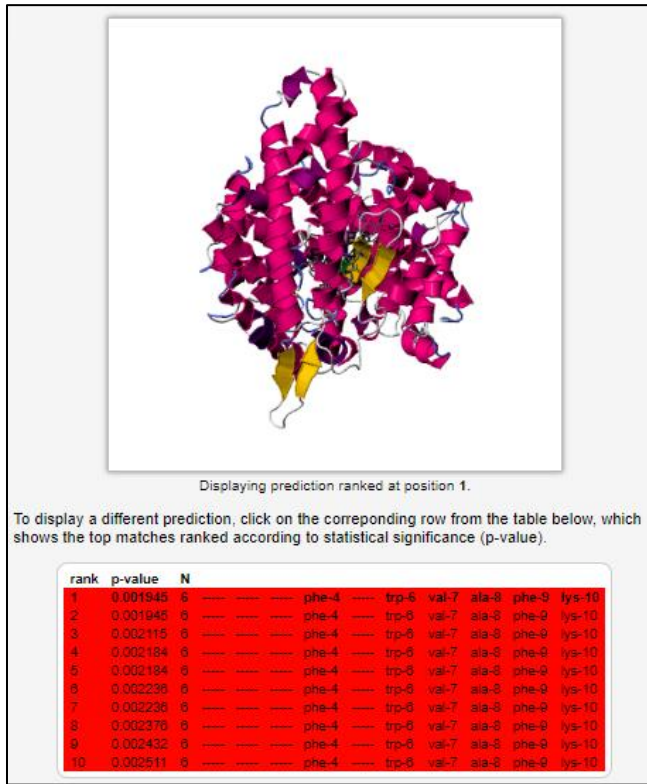
Şekil 76. Bromelain muamelesi ile oluşturulan peptitler arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan FFFPGPNK peptitinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Solda enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, sağdaki görüntüde etkileşim odaklı %200 büyütme ("zoom") uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.



Tablo 47. FFFPGPNK peptitinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Sekans	Aktif amino asitler	p-değeri	ACE üzerinde bağlanılan amino asitler
FFFPGNK	Phe-2 Phe-3 Pro-4 Gly-5 Pro-6 Asn-7	4,211 E-5	Trp279, Gln281, His353, Ala354, Ser 355, Ala356, His383, Glu384, His 387, Glu 411, Phe457, Phe460, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523

Dolayısıyla en muhtemel modele göre 8 amino asitten oluşan FFFPGPNK peptik peptiti, ACE üzerinde 16 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir ve bu sayede inhibisyona sebep olabilmektedir. Modelin etkinliğini göstermek için ACE'nin toplamda 1306 amino asit uzunluğunda olduğu da belirtilmelidir.



Şekil 77. Papain muamelesi ile oluşturulan peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan kısa peptidin (≤ 10 amino asit, SEGFEWVAFK) ACE ile etkileşiminin şematize

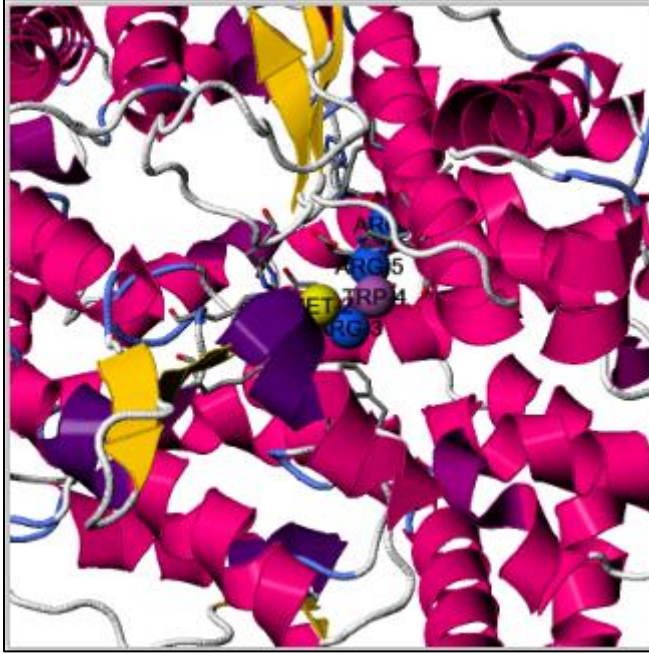
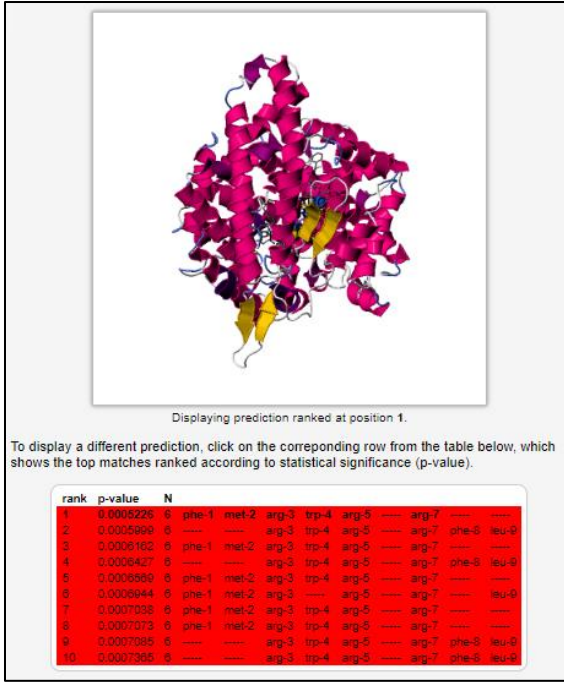
edilmesi. Solda enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, sağdaki görüntüde etkileşim odaklı %200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Tablo 48. SEGFEEVAFK 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
SEGFEEVAFK	Phe-4 Trp-6 Val-7 Ala-8 Phe-9 Lys-10	0.001945	Asn 66, Gln281, His353, Ala354, Ser355, Ala356, Trp357, His383, Glu384, His387, Phe391, His410, Glu 411, Phe457, His513, Tyr520, Tyr523, Phe527

Dolayısıyla en muhtemel modele göre 10 amino asitten oluşan SEGFEEVAFK peptidi, ACE üzerinde 18 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir ve bu sayede inhibisyona sebep olabilmektedir. Modelin etkinliğini göstermek için ACE'nin toplamda 1306 amino asit uzunluğunda olduğu da belirtilmelidir.

Önceki tablo ile karşılaştırdığımızda bağlantı noktaları benzer olmakla birlikte bu peptidin daha fazla amino asit ile etkileştiği anlaşılmaktadır.



Şekil 78. 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 49. 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, His 387, Phe409, His410, Glu 411, 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 ve bu sayede inhibisyona sebep olabilmektedir. Modelin etkinliğini göstermek için ACE'nin toplamda 1306 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 (SEGFVAVFK) 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.

Aşağıdaki tabloda (Tablo 50), pozitif kontrol olarak iyi bilinen bir ACE inhibitörü VPP ile bir kıyaslama yapılmaktadır.

Tablo 50. Mevcut peptitlerin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi ve bu listelerin VPP peptidine ait liste ile kıyaslanması.

Sekans	Aktif amino asitler	p-değeri	ACE üzerinde bağlanan amino asitler
FFFPGPKNK	Phe-2 Phe-3 Pro-4 Gly-5 Pro-6 Asn-7	4,211 E-5	Trp279, Gln281, His353, Ala354, Ser 355, Ala356, His383, Glu384, His 387, Glu 411, Phe457, Phe460, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523
SEGFVAVFK	Phe-4 Trp-6 Val-7 Ala-8 Phe-9 Lys-10	0.001945	Asn 66, Gln281, His353, Ala354, Ser355, Ala356, Trp357, His383, Glu384, His387, Phe391, His410, Glu 411, Phe457, His513, Tyr520, Tyr523, Phe527
FMRWRDRFL	Phe-1 Met-2 Arg-3 Trp-4 Arg-5 Arg-7	0,0005226	Gln281, His353, His383, His 387, Phe409, His410, Glu 411, 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 hiçbiri, VPP tripeptidine spesifik değildir. Mevcut ACE aktif fraksiyonlarda bulunan peptitlerin ve henüz dizilimi belirlenememiş diğer peptitlerin analizleri ile ilgili çalışmalar halen sürdürülmektedir.

4.3.5. Gıda uygulamaları ve ürün analizleri

4.3.5.1. Ürünlerin fabrika analizleri

Duyusal Analizler

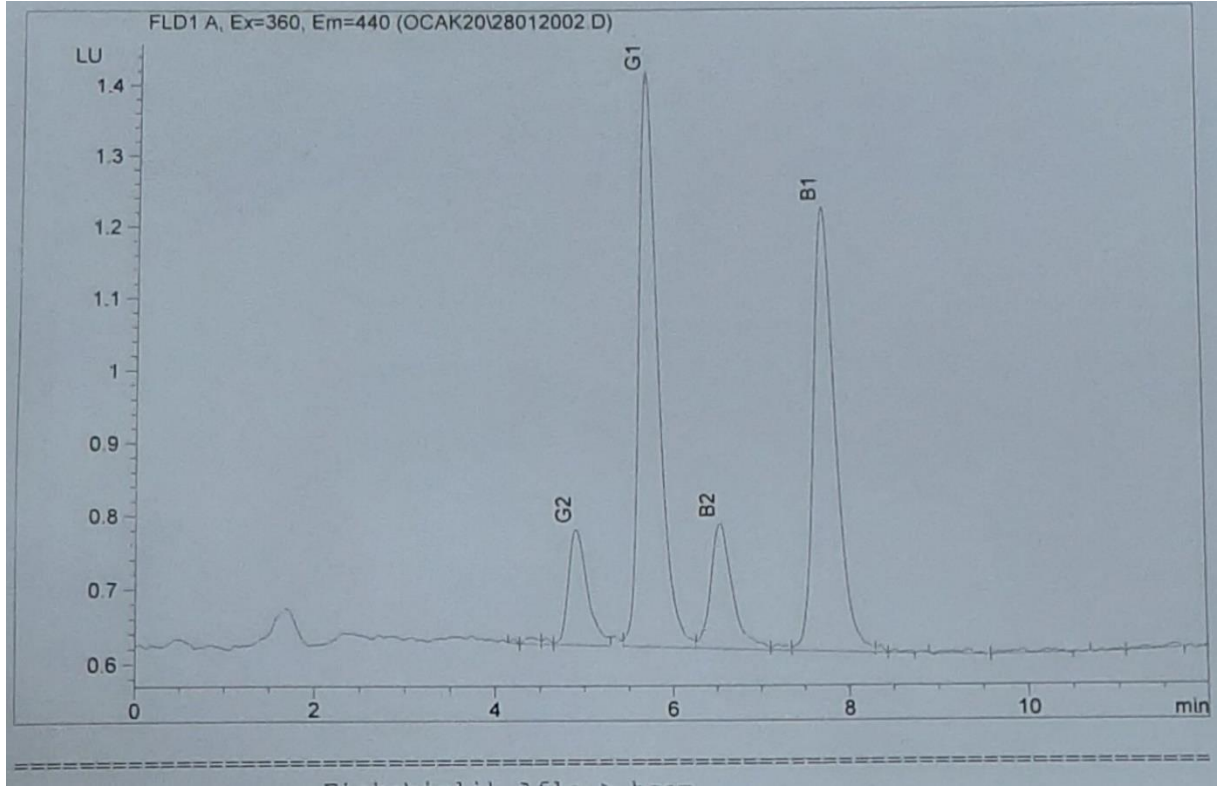
Renk analizi Minolta renk tayin cihazı ile yapılmıştır. Fındığa ait "L" değerinin normal aralıkta olduğu görülmüştür.

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

Hammadde olan kavurulmuş fındığın nem oranının %1.8 olması istenir ve bu aralıkta değilse tekrar kavurma işlemleri yapılır. Çalışmadaki örneğe ait nem değeri %2.11 olarak bulunmuştur. Örneğe ait asitlik 0.51 (100 g numunede oleik asit cinsinden, g) olarak bulunmuştur ve bu ideal aralıktadır. Peroksit değeri "0" olarak bulunmuştur.

Şekil 79'da aflatoksin analizine ait kromatogram görüntüsü verilmiştir.



Şekil 79. Analiz edilen fındık örneğine ait kromotogram görüntüsü

Mikrobiyolojik analizler

Çalışmalarımızda kullanılan temel ham madde olan fındığa yapılan mikrobiyolojik ekimlerde kullanılan yöntemler ve elde edilen sonuçlar Tablo 33 üzerinde sunulmaktadır.

Tablo 51. Mikrobiyolojik analiz sonuçları

Analiz adı	Analiz sonucu (kob/g)	Limit değerler	Methodu	Uygunluk
Toplam bakteri	200	2000 kob/g	PCA-35 °C 48 saat	uygun
Maya-Küf	<10	50 kob/g	Ygc Agar-25 °C 5-7 gün	uygun
Koliform	-	-	Compcat Dry EC. 35±2 °C 24 saat	uygun
<i>Escherichia coli</i>	-	-	Compcat Dry EC. 35±2 °C 24 saat	uygun
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	Compcat Dry - SA 35±2 °C 24±2 saat	uygun
<i>Salmonella</i> 25g. Da	-	-	Compcat Dry - SL 35±2 °C 24±2 saat	uygun

4.3.5.2. Ürünlerin alerjenisite testleri

Uygun bir analiz kiti ve standart ile oluşturulan kalibrasyon eğrisine göre örneklerdeki alerjen miktarı hesaplanmıştır (Tablo 52).

%1 fındık proteini 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 oranlarında alerjen proteinleri baskılama görülmüştür. %1 fındık proteini içeren fındık kreması örneğinde ise herhangi bir baskılama olmamıştır.

Tablo 52. Alerjen testi numuneleri ve numunelerde belirlenen alerjen madde miktarı (mg/kg)

Numune	Fındık alerjeni (mg/kg)
Fındık ezmesi blank	567500
Fındık ezmesi %1 fındık proteini ilaveli	77.6
Fındık ezmesi %1 PAF4 ilaveli	529500
Fındık ezmesi %1 BRF10 ilaveli	79.12
Fındık ezmesi %1 PEF6 ilaveli	650500
Kakaolu fındık kreması blank	217000
Kakaolu fındık kreması %1 fındık proteini ilaveli	226000
Kakaolu fındık kreması %1 PAF4 ilaveli	181500
Kakaolu fındık kreması %1 BRF10 ilaveli	191500
Kakaolu fındık kreması %1 PEF6 ilaveli	184000

4.3.5.3 Ürünlerin biyoaktivite testleri

Ürünlerin biyoaktivite testlerinde, peptit fraksiyonları için uygulanan metotlar uygulanmıştır. Gıda matrisinin etkisini anlamak için ürünlere eklenen fındık proteini, PAF4, BRF10 ve PEF6 ürünlerdeki oranlarıyla suda hazırlanarak sindirim testleri yapılmıştır. Sindirim testleri sonrası analizler için uygun hale gelen ürünler ile çalışılmıştır. GI, gastrointestinal testler sonrası ürünü ifade ederken; Nuga kakaolu fındık kremasını ifade etmektedir.

ACE önleyici aktivite testi

Tablo 53'deki sonuçlara göre fındık proteini, PAF4, BFR10, PEF6 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan ACE inhibisyon aktivitesi göstermektedir. PEF6 fraksiyonu az oranda kakaolu fındık kreması ve fındık ezmesi ürünlerinde ACE inhibisyon aktivitesi göstermektedir. BRF10 fraksiyonunun fındık ezmesi ürününde az oranda ACE inhibisyon aktivitesi artışına neden olduğu, kakaolu fındık kreması ürününde ise herhangi bir ACE inhibisyon aktivitesine etkisi olmadığı görülmektedir. Fındık proteini 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, PAF4, BFR10, 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 olumsuz etkisinin olduğu düşünülmektedir. Fındık ezmesi ve kakaolu fındık kreması ürünlerinde eklenen protein ve fraksiyonların pozitif kontrole yakın değerlerde aktivite göstermesi de yine gıda matrisinden kaynaklanabilir.

Tablo 53. Ürünlerin %ACE inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %ACE İnhibisyon Aktivitesi
GI-Blank	94,85±0,34
GI-%1 Fındık proteini (suda)	92,78±0,26
GI-%1 PAF4 (suda)	92,45±0,23
GI-%1 BRF10 (suda)	91,64±0,22
GI-%1 PEF6 (suda)	91,20±0,19
GI-%16 Nuga-Blank	91,34±0,19
GI-%16 Nuga-%1 Fındık proteini	90,31±0,22
GI-%16 Nuga-%1 PAF4	91,26±0,21
GI-%16 Nuga-%1 BRF10	91,39±0,15
GI-%16 Nuga-%1 PEF6	91,68±0,25
GI-%16 Nuga-%1 Kaptopril	93,50±0,30
GI-%70 Fındık ezmesi-Blank	94,53±0,40
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 Fındık proteini	93,14±0,27
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PAF4	94,21±0,23

GI-%70 Fındık ezmesi -%1 BRF10	94,84±0,40
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PEF6	94,82±0,35
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 Kaptopril	95,26±0,40

DPP-IV önleyici aktivite testi

Tablo 54'deki sonuçlara göre PAF4 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan az oranda, kakaolu fındık kreması ve fındık ezmesi ürünlerinde %50 civarında DPP4 inhibisyon aktivitesi göstermektedir. PAF4 fraksiyonu için fındık ezmesi ürününün blank ürününe bakıldığında fındık ezmesi için yaklaşık %1, kakaolu fındık kreması için yaklaşık %7'lik bir DPP4 inhibisyon aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir. Fındık proteini için fındık ezmesi ürününün blank ürününe bakıldığında fındık ezmesi için yaklaşık %5, kakaolu fındık kreması için yaklaşık %4'lük bir DPP4 inhibisyon aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir. BRF10 fraksiyonunun kakaolu fındık kreması için yaklaşık %9'luk bir DPP4 inhibisyon aktivitesi artışına neden olduğu, fındık ezmesi ürününde ise herhangi bir DPP4 inhibisyon aktivitesine etkisi olmadığı görülmektedir. PEF6 fraksiyonunun kakaolu fındık kreması için yaklaşık %13'lük bir DPP4 inhibisyon aktivitesi artışına neden olduğu, fındık ezmesi ürününde ise herhangi bir DPP4 inhibisyon aktivitesine etkisi olmadığı görülmektedir.

Tablo 54. Ürünlerin %DPP4 inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %DPP4 İnhibisyon Aktivitesi
GI-Blank	-
GI-%1 Fındık proteini (suda)	-
GI-%1 PAF4 (suda)	0,78±0,058
GI-%1 BRF10 (suda)	-
GI-%1 PEF6 (suda)	-
GI-%16 Nuga-Blank	43,78±0,045
GI-%16 Nuga-%1 Fındık proteini	47,93±0,075
GI-%16 Nuga-%1 PAF4	50,13±0,060
GI-%16 Nuga-%1 BRF10	52,72±0,056
GI-%16 Nuga-%1 PEF6	56,61±0,036
GI-%70 Fındık ezmesi-Blank	51,94±0,077

GI-%70 Fındık ezmesi -%1 Fındık proteini	56,87±0,045
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PAF4	52,46±0,069
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 BRF10	48,19±0,011
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PEF6	39,64±0,023

Antioksidatif aktivite testleri

DPPH yöntemi

Tablo 55'deki sonuçlara göre fındık proteini, PAF4, BFR10, PEF6 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan DPPH süpürme aktivitesi göstermektedir. Fındık proteininin fındık ezmesi için yaklaşık %1'lik bir 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 %6, %18, %6 oranında bir DPPH süpürme aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir.

Tablo 55. Ürünlerin %DPPH süpürme aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %DPPH Süpürme Aktivitesi
GI-Blank	43,23±0,21
GI-%1 Fındık proteini (suda)	43,61±0,21
GI-%1 PAF4 (suda)	37,57±0,01
GI-%1 BRF10 (suda)	42,77±0,13
GI-%1 PEF6 (suda)	44,88±0,04
GI-%16 Nuga-Blank	54,08±0,19
GI-%16 Nuga-%1 Fındık proteini	49,04±0,21
GI-%16 Nuga-%1 PAF4	46,34±0,32
GI-%16 Nuga-%1 BRF10	47,28±0,25
GI-%16 Nuga-%1 PEF6	47,49±0,18
GI-%70 Fındık ezmesi-Blank	54,79±0,36

GI-%70 Fındık ezmesi -%1 Fındık proteini	55,11±0,22
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PAF4	60,320,06
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 BRF10	72,96±0,69
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PEF6	60,38±0,15

Demir şelasyon aktivitesi testi

Tablo 56'daki sonuçlara göre fındık proteini, PAF4, BFR10, 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 fındık ezmesi ürününün blank ürününe bakıldığında fındık ezmesi için yaklaşık %4, kakaolu fındık kreması için yaklaşık %42'lik bir demir şelasyon aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir. Fındık proteini, PAF4 ve BRF10 fraksiyonlarının kakaolu fındık kreması ürününde demir şelasyon aktivitesine herhangi bir etkisi olmadığı görülmektedir. PAF4 ve BRF10 fraksiyonlarının fındık ezmesi ürününde blank ürününe göre sırasıyla yaklaşık %5 ve %8 oranında bir demir şelasyon aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir. Fındık proteinin fındık ezmesi ürününde demir şelasyon aktivitesine herhangi bir etkisi olmadığı görülmektedir.

Tablo 56. Ürünlerin %demir şelasyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama %Demir Şelasyon Aktivitesi
GI-Blank	61,38±0,002
GI-%1 Fındık proteini (suda)	68,08±0,004
GI-%1 PAF4 (suda)	61,31±0,001
GI-%1 BRF10 (suda)	60,38±0,004
GI-%1 PEF6 (suda)	82,31±0,002
GI-%16 Nuga-Blank	47,69±0,003
GI-%16 Nuga-%1 Fındık proteini	21,54±0,004
GI-%16 Nuga-%1 PAF4	60,46±0,002
GI-%16 Nuga-%1 BRF10	49,23±0,006
GI-%16 Nuga-%1 PEF6	89,23±0,704
GI-%70 Fındık ezmesi-Blank	67,08±0,003
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 Fındık proteini	60,31±0,001

GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PAF4	72,31±0,007
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 BRF10	75,38±0,035
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PEF6	71,54±0,021

FRAP yöntemi

Tablo 57'deki sonuçlara göre fındık proteini, PAF4, BFR10, PEF6 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan demir (III) iyonu indirgeyici aktivite göstermektedir. Fındık proteini, PAF4, BRF10 ve PEF6 fraksiyonlarının fındık ezmesi ürünüde blank ürününe göre sırasıyla yaklaşık %4, %4, %2 ve %3 oranında bir demir (III) iyonu indirgeyici aktivite artışına neden olduğu görülmektedir. Fındık proteini, PAF4, BRF10 ve PEF6 fraksiyonlarının fındık ezmesi ürünüde blank ürününe göre sırasıyla yaklaşık %1 oranında bir demir (III) iyonu indirgeyici aktivitesi artışına neden olduğu görülürken PEF6 fraksiyonunun demir şelasyon aktivitesine herhangi bir etkisi olmadığı görülmektedir.

Tablo 57. Ürünlerin % demir (III) iyonu indirgeyici aktivite değerleri

Örnek	Ortalama % Demir(III) İyonu İndirgeme Aktivitesi
GI-Blank	69,58±0,002
GI-%1 Fındık proteini (suda)	79,63±0,001
GI-%1 PAF4 (suda)	73,16±0,004
GI-%1 BRF10 (suda)	76,85±0003
GI-%1 PEF6 (suda)	77,13±0,003
GI-%16 Nuga-Blank	84,44±0,001
GI-%16 Nuga-%1 Fındık proteini	88,67±0,003
GI-%16 Nuga-%1 PAF4	88,60±0,006
GI-%16 Nuga-%1 BRF10	86,94±0,002
GI-%16 Nuga-%1 PEF6	87,77±0,006
GI-%70 Fındık ezmesi-Blank	85,32±0,003
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 Fındık proteini	85,72±0,002

GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PAF4	86,35±0,006
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 BRF10	86,92±0,006
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PEF6	66,81±0,607

Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi

Tablo 58'deki sonuçlara göre fındık proteini, PAF4, BFR10, PEF6 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan hidroksil radikali tutma aktivitesi göstermektedir. Fındık ezmesi matrisinin hidroksil radikali tutma aktivitesini azaltıcı bir etki gösterdiği söylenebilir. Kakaolu fındık kreması ürününde ürününde blank ürününe göre herhangi bir hidroksil radikali tutma aktivitesi artışı olmamıştır. Kakaolu fındık kreması ürünündeki aktivite değerlerinin matris olmadan yapılan testler ile yaklaşık aynı sonucu verdiği görülmektedir. Bu nedenle ürünlerle ilgili sonuçların matris kaynaklı değil, analiz metodunun mekanizması ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Tablo 58. Ürünlerin %hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % hidroksil radikali tutma Aktivitesi
GI-Blank	62,77±0,001
GI-%1 Fındık proteini (suda)	60,99±0,001
GI-%1 PAF4 (suda)	59,79±0,001
GI-%1 BRF10 (suda)	60,06±0,051
GI-%1 PEF6 (suda)	57,83±0,001
GI-%16 Nuga-Blank	62,05±0,001
GI-%16 Nuga-%1 Fındık proteini	58,19±0,001
GI-%16 Nuga-%1 PAF4	59,13±0,001
GI-%16 Nuga-%1 BRF10	60,87±0,001
GI-%16 Nuga-%1 PEF6	52,47±0,000
GI-%70 Fındık ezmesi-Blank	45,24±0,000
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 Fındık proteini	48,77±0,001

GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PAF4	45,93±0,001
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 BRF10	39,43±0,001
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PEF6	33,83±0,004

Superoksit anyon tutma aktivitesi

Tablo 59'daki sonuçlara göre fındık proteini, PAF4, BFR10, PEF6 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan superoksit anyon tutma aktivitesi göstermektedir. Kakaolu fındık kreması ve fındık ezmesi matrisinin superoksit anyon tutma aktivitesini azaltıcı bir etki gösterdiği söylenebilir. Fındık proteini, PAF4, BFR10, PEF6 fraksiyonu herhangi bir matris olmadan yapılan testlerdeki aktivitesini fındık ezmesi ve kakaolu fındık kreması matrisinde gösterememiştir.

Tablo 59. Ürünlerin %superoksit anyon tutma aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % Superoksit Anyon Tutma Aktivitesi
GI-Blank	78,80±0,07
GI-%1 Fındık proteini (suda)	79,45±0,09
GI-%1 PAF4 (suda)	79,48±0,09
GI-%1 BRF10 (suda)	81,39±0,10
GI-%1 PEF6 (suda)	76,37±0,09
GI-%16 Nuga-Blank	73,25±0,04
GI-%16 Nuga-%1 Fındık proteini	72,92±0,04
GI-%16 Nuga-%1 PAF4	72,92±0,03
GI-%16 Nuga-%1 BRF10	75,52±0,11
GI-%16 Nuga-%1 PEF6	75,19±0,11
GI-%70 Fındık ezmesi-Blank	75,25±0,04
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 Fındık proteini	74,81±0,04

GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PAF4	74,89±0,04
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 BRF10	71,20±0,03
GI-%70 Fındık ezmesi -%1 PEF6	71,23±0,02

4.4 Proje hedeflerine ulaşma durumunun değerlendirilmesi

Proje önerisinde ulaşılmak istenen hedefler şöyle sıralanmıştır:

1. Fındık proteini konsantrelerinden katma değerli biyoaktif peptit ürünleri üretilmesi için enzimatik yöntemlerden yararlanılması,
2. Peptitlerin farklı saflık düzeylerinde üretilebilmesi amacıyla saflaştırma ve fraksiyonlara ayırma yöntemlerinden yararlanılması,
3. Böylelikle her bir saf proteinin ya da fraksiyonun muhtemel biyoaktif özelliklerinin ortaya konulması,
4. Yüksek saflıkta hazırlanan biyoaktif peptitlerin ACE-önleyici, DPP-IV önleyici ve anti-oksidadif aktivitelerinin uygun *in vitro* testlerle incelenmesi,
5. Bu işlemlere bağlı olarak fındık küspesinden elde edilecek başlıca biyoaktif peptitlerin ve bu peptitlerin ait oldukları proteinlerin saptanmasıdır.
6. Böylelikle ilgili numunelerin biyoaktifliğinin gösterilmesine ek olarak düşük maliyetle endüstriyel yan ürünlerden üretilebilirliğinin incelenmesi,
7. Biyoaktifliği, kararlılık koşulları ve düşük maliyetli üretilebilirliği detaylı olarak incelenmiş olan peptit ürünlerinin endüstriyel ürün uygulamalarına uygunluğunun araştırılması,
8. Söz konusu ürünlerin **FİSKOBİRLİK** tesislerinde gıda uygulamalarında (sütlü fındık kreması ve fındık ezmesi) değerlendirilmesi,
9. Bu gıda ürünlerinin firma prosedürlerine uygun olarak ilgili kompozisyonel ve reolojik analizlerden geçirilmeleri,
10. Buna bağlı olarak bu ürünlerin gıda ve gıda takviyesi endüstrilerinde ticarileştirilmesine yönelik ön adımların atılması,
11. Buna paralel olarak elde edilecek peptitlerin uzun vadede diğer tüketici ürünleri (kozmetik vb.) ile eczacılık ürünleri ve biyomedikal uygulamalarda kullanımının da önünün açılması,
12. Nihai olarak bu değerli ürünümüze ait protein fraksiyonlarının itibarının ve biyoaktif özelliklerinin artırılması ve bu esnada alerjik özelliklerin baskılanması hedeflenmektedir.

Bu hedeflerin ne ölçüde karşılandığı da aşağıdaki paragraflarda özetlenmiştir:

Öncelikle fındık posaları kullanılarak protein konsantreleri, daha doğru bir tabirle, yüksek konsantrasyonlarda protein içeren fındık protein izolatları üretilmiştir. Bu izolatlar uygun koşullar altında 6 farklı enzim ile muamele edilerek bir dizi protein hidrolizatı üretilmiştir **(1. Hedef karşılandı)**.

Üretilen hidrolizatlardaki peptitlerin farklı saflık ve kompozisyon düzeyinde üretilebilmesi için bir dizi FPLC tekniğinden yararlanılmıştır. Bu sayede onlarca farklı fraksiyon elde edilmiş ve sonraki aşamalarda bunların bazılarının biyoaktif özellikler taşıdığı anlaşılmıştır **(2. ve 3. Hedef karşılandı)**. Söz konusu testler bütün fraksiyonlara uygulanmış ve bunların ACE-önleyici, DPP-IV önleyici ve anti-oksidatif aktiviteleri incelenmiştir **(4. Hedef karşılandı)**. LC-Q-TOF/MS analizleri sonucunda ortaya çıkan dizilimlerin de hangi proteinlere ait olduğu anlaşılmıştır. Böylelikle bu aktif maddelerin yan ürünlerden üretilmesi de incelenmiştir **(5. ve 6. Hedef karşılandı)**.

Üretilen peptit fraksiyonları yüksek miktarlarda üretilerek FİSKOBİRLİK tesislerine götürülmüş ve burada gıda uygulamalarında değerlendirilmiştir. Burada anılan detaylara yönelik tek farklılık sütlü fındık kreması yerine kakaolu fındık kreması üretilmiş olmasıdır. Aynı zamanda ikinci ürün olarak fındık ezmesine peptit eklenmesi hususu da çalışılmıştır **(7. ve 8. Hedef karşılandı)**. Bu numunelerin analizinde firma olanaklarının elverdiği ve proje bursiyerinin tesiste bulunabildiği dönemde cihazların müsait olduğu ölçüde fizikokimyasal analizler ve mikrobiyolojik testler yürütülmüştür. Ne yazık ki tesiste reolojik analizleri yürütme olanağı olmadığı anlaşılmıştır. Bu eksiklik ihmal edilebilirse, **9. Hedefin de karşılandığını söyleyebiliriz.**

10-12. Hedefler, sonraki çalışmalar için öngörüler olarak belirlenmiştir. Çalışmalarımızın 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. Dolayısıyla 10. ve 11. Hedefler atılmış ön adımlar olarak değerlendirilirse karşılanmıştır. Ekibimizin söz konusu malzemeleri bu alanlarda değerlendirme çabaları hâlihazırda devam etmektedir. Yapılan alerji testleri sonucunda ise, alerjik baskılamanın kısmen (bazı durumlarda) gerçekleştiği anlaşılmıştır. Dolayısıyla 12. Hedefin de gereği gibi karşılandığı düşüncesindeyiz.

Bu verilere bağlı olarak ihmal edilebilir bazı eksiklikler ve bazı eklemeler ile projemizin hedeflere genel olarak ulaştığı düşüncesindeyiz.

5. SONUÇ

Ülkemiz için ekonomik öneme sahip Giresun tombul fıncığının yağı alındıktan sonra kalan posalarında yüksek oranda protein bulunmaktadır. Çalışmamızda bu proteinler alkali ekstraksiyonu-izoelektrik çöktürme yöntemiyle konsantre edilmiş ve 6 farklı enzimle hidroliz edilmiştir. Sonrasında hidrolizatlardan anyon değişim bazlı fraksiyonlar elde edilmiş ve bu fraksiyonlarda (ACE ve DPP-IV önleyici ve antioksidatif) aktivite testleri yapılmıştır. Bu deneylerdeki en yüksek biyoaktivite değerleri genellikle ACE testlerinde görülmüştür. Bunun yanı sıra DPP-4 ve antioksidan testlerinde çok sayıda fraksiyonda aktivite gözlenmiş ancak aktivite değerleri nispeten düşük bulunmuştur. Aktivite testlerinin ardından ACE inhibisyonu ve DPP-IV inhibisyonu aktivitesi gösteren fraksiyonlar LC-MS/MS analiz teknikleriyle incelenerek aktif fraksiyonlara ait peptit dizilimleri belirlenmiştir. Ancak bazı peptit moleküllerinin yapıları bu yolla belirlenememiştir. Bu durumun yeni proteinlerin varlığına ya da daha önce veri bankalarına işlenmemiş fındık proteinlerine işaret ettiği düşünülmektedir. Aynı zamanda iyonize olmayan bazı peptitlerin de belirlenemeyebileceği anlaşılmaktadır.

Çalışmada dizilimleri belirlenen peptitlerin, bazı fizikokimyasal ve biyoaktif özellikleri, literatürde bulunan *in silico* yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda, aktif fraksiyonlarının tamamına yakınında hem aktif hem de aktif olmayan peptitlerin bulunduğu anlaşılmıştır. Bu *in silico* yöntemlerle çalışmada en az 29 adet ACE aktif ve 14 adet DPP-IV aktif peptit belirlenmiştir. Bu peptitlerin hiçbirinde toksik etkilerin ortaya çıkması beklenmemektedir. Buna ek olarak, bazı alerjen proteinlerin de parçalandığı ve muhtemelen alerjik etkilerinin azalabileceği anlaşılmaktadır. Endüstriyel ürün denemeleri sonucunda da proje önerisinde öngörüldüğü gibi bazı numunelerde alerjik etkilerin baskılandığı gözlenmiştir. Bazı biyoaktif özellikler endüstriyel ürünlerde de korunurken bazı etkiler kaybolmakta ya da numunelerin analizlerde fazlaca seyrelmesine paralel olarak etkiler ölçüm sınırlarının altına inmektedir. Uzun vadede konunun mekanistik açıklaması ile ilgili çalışmalar sürdürülecektir. Bununla birlikte proje önerisinde de öngörüldüğü gibi, uygun koşullar altında enzimatik muamelelerin fındık proteinlerinin alerjik özelliklerini azaltma potansiyeli bulunduğu anlaşılmaktadır.

Araştırmada hem *in vitro* aktivitesi bulgularan hem de bu aktiviteleri *in silico* tekniklerce doğrulanan peptitlerin inhibisyon mekanizması yine *in silico* teknikler kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca çalışmada DPP-IV inhibisyon parametreleri bulunan peptitler arasında PeptideRanker değerine göre en yüksek aktiviteye sahip olan YDLDFK

peptidinin inhibisyon mekanizması incelenmiştir. Sonuçta YDLDFK triptik peptidinin DPP-IV üzerinde 10 muhtemel bağlanma noktasına sahip olduğu bulunmuştur. ACE aktif peptitleri arasından her bir enzim için en etkin olanının ACE ile etkileşim mekanizması incelenmiş ve bu inhibitörlerin ACE'nin hangi amino asitleri ile etkileşebileceği belirlenmiştir. Buna göre farklı enzimlerle muamele sonucu oluşan SPLAGR (tripsin), VPHW (kimotripsin) ve PGHF (termolisin) peptitleri, ACE üzerinde sırasıyla 16, 10 ve 11 muhtemel bağlanma noktasına sahip olduğu bulunmuştur.

Dolayısıyla bu çalışmada yağı alınmış fındık posaları kullanılarak katma değer sağlayabilecek veriler elde edilmiştir. Aktif fraksiyonlara ait sinyallerin bir kısmı veri tabanlarında olan proteinlerle eşleşmemesine bağlı olarak yeni protein ve peptitlerin olabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla bu düşüncenin doğrulanması ve bu bileşenlerin belirlenmesi üzerine çalışmalar yapılması gerekmektedir. Belirlenen ve henüz belirlenemeyen (muhtemelen yeni) aktif peptitler sentetik olarak elde edilerek gerçek aktivitelerinin ve inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi üzerine yapılacak çalışmalar, fındık peptitlerinin bu konudaki potansiyelini daha net bir biçimde ortaya çıkaracaktır. Bununla birlikte saf halde elde edilecek peptitlerin ürün formülasyonlarına ilavesi ile ilgili daha ileri çalışmalar yürütülebilecektir. Ayrıca fındıkta bu aktiviteleri geliştirici çalışmaların yanı sıra antimikrobiyal ve antikanser aktivitesi gibi farklı biyoaktif özellikleri üzerine yeni çalışmalar yapılabilir. Gelecekte bu aktif peptitler farmakolojik çalışmalara konu edilebilir veya kontrolsüzce tüketilebilen gıdalarda fonksiyonel bileşik olarak kullanılabilirliği değerlendirilebilir. Bu sayede hipertansiyon ve diyabetle mücadelede önemli katkılar sağlayabilmesi mümkün olabilecektir. Ekibimizin bu alanlarda çalışmaları devam etmektedir ve orta-uzun vadede ticarileştirilebilir ürünlerin açığa çıkarılması bağlamında ilgili sektörler ile diyalogumuz da sürmektedir.

Serbest radikal türlerin fazla miktarda oluşması oksidatif strese neden olmaktadır. Yapılan araştırmalar oksidatif stresin diyabet, kanser, şizofreni, Alzheimer gibi birçok hastalığın patolojisi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Serbest radikallerin hücresel yaşlanma ve nöral hasara yol açtığı bildirilmiştir. Demir iyonunun yaşın artmasıyla beraber beyinde ve nörodejeneratif hastalıklardan etkilenen beyin alanlarında biriktiği belirlenmiştir. Bu nedenle Alzheimer hastalığına karşı kullanılacak herhangi bir ajanın AChE inhibitör etkisiyle beraber antioksidatif etkisinin de olması oldukça avantajlıdır.

Bütün bunların yanında, saflaştırılmış fraksiyonların maliyeti göz önüne alınarak total hidrolizatların ve/veya kısmen saflaştırılmış fraksiyonların da fonksiyonel gıda ve kozmetiklerin yapımında kullanılabileceği düşünülmelidir. Bu bağlamda mevcut metodolojinin birden fazla biyoaktif fraksiyon ortaya çıkarma bağlamında oldukça etkin



olduğu ve farklı amaçlarla farklı fraksiyon ya da hidrolizatların kullanılabileceği anlaşılmaktadır. Biyoaktif peptitler ile ilgili çalışmaların çoğunda aktif ve saflaştırılmış ya da sentetik olarak üretilmiş peptitlerin bulunduğu ya da kullanıldığı bilinmektedir. Buradaki bulgular kolektif olarak fındık protein hidrolizatlarının ya da bunlara ait fraksiyonların değerlendirilebileceği anlamına gelmektedir. Bu nispeten yeni bir bulgudur ve özellikle ACE-önleyici potansiyel bağlamında fındık proteinlerinin potansiyeline işaret etmektedir.

Fraksiyonlama teknolojileri birçok farklı nitelik, kompozisyon ve konsantrasyonda aktif peptitlerin üretilmesini sağlayabilmektedir. Bu teknolojiler sonunda fonksiyonel gıdalar, kozmetikler ve gıda takviyelerinde kullanılmaya uygun değerli gıda bileşenleri, fındık ham maddelerinden yola çıkılarak üretilebilir. Örneğin, sadece basit metodolojik farklılıklar ile suda ya da başka çözücülerde çözünen ya da hiç çözünmeyen, dolayısıyla farklı formülasyonlarda kullanılmaya aday bileşenler üretilebilir. Bununla birlikte ekibimizin birincil uygulama ve hedef alanı, projede de ürün uygulamalarının yapıldığı fonksiyonel gıda ürünleri alanıdır.

Bütün bu verilere bağlı olarak temelde şu hususlar başarılmıştır:

- Farklı biyoaktif özellikleri bulunan bir dizi farklı ham maddenin sıvı ve toz formlarda üretilmesi,
- Böylelikle endüstriyel yan ürünlerden katma değer üretme potansiyelinin ortaya çıkarılması,
- Muhtemel etkinliklerinin yanında toksik özellikleri bulunmayan bu bileşiklerin tüketici ürünlerinde kullanım potansiyeli olduğu, özellikle fonksiyonel gıdalarda kullanılma potansiyellerinin olduğunun gösterilmesi,
- Birçok farklı senaryo ve formülasyon için uygun bileşiklerin konsantre olarak üretilmesi,
- Muhtemel kullanım alanları ile ilgili gerçek denemelerin tesis ortamında yürütülmesi,
- Analizlerin tesis ortamında yürütülmesi,
- Proses ve sindirim etkilerinin incelenmesi ve hangi durumlarda bu malzemelerin halen kullanılabilir olacağının incelenmesi,
- Gelecekteki çalışmalar için bu kararlılık verilerinin baz alınmasının sağlanması,
- Aynı zamanda önceden de savlandığı gibi uygun proses koşullarında alerjenik özelliklerin azaltılabileceğinin gösterilmesi,

- Bu bağlamda milli bir ürünümüz olan fındığın katma değerlendirilmesi, alerjik problemler ile ilgili literatürde bulunan haklı eleştirilere teknolojik bir alternatif sağlanması.

Aynı zamanda, önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi proje önerisinde bildirilmiş bulunan proje hedeflerinin ufak aksaklıklar dışında karşılandığı, bazı bakımlardan bunların ötesine de geçildiği anlaşılmaktadır.

Başarılamayan temel husus ise şöyledir:

Literatürde 400'ün üzerinde fındık proteinin olduğu bilinmektedir. Proteoliz, binlerce farklı peptitin açığa çıkmasına sebep olmaktadır. Oluşturulan fraksiyonlar, aktif veya inaktif yüzlerce peptit molekülünü aynı anda bünyesinde bulundurabilmektedir. Moleküler saflaştırma ya da sentez yapılmadığı sürece her bir molekülün hangi biyoaktif mekanizmada hangi mekanistik rolü oynadığını anlamak yıllara dayanan bir çalışma gerektirmektedir. Dolayısıyla özellikle antioksidatif mekanizmaların bu aşamada açıklanması nispeten zordur ve kısıtlı bir değerlendirme yapılmıştır. Özellikle birden fazla molekülün bir arada bulunması, etkileşimleri ve her birinin konsantrasyonunun ne olduğunun bilinmemesi bu yorumlama süreçlerini zorlaştırmaktadır.

Bununla birlikte endüstriyel kullanım nispeten saflaştırılmamış hidrolizat ya da fraksiyonlar için mümkün olabilir diye düşünüyoruz. Sentetik ya da iyice saflaştırılmış peptitler oldukça pahalı ham maddelerdir.

Mevcut durumda, çalışmanın en azından 4 ya da 5 temel bölümünün makale formatında yayınlanması planlanmaktadır. EK-1 revizyon sürecinde bulunan bir makale taslağını içermektedir. Ek bir makale, ön datalarla ilgili olarak EK-2'de verilmiştir. EK-3 yayınlanmış bir makaleyi içermektedir. Ürün uygulamalarını içeren 2 SCI makale ile özellikle antioksidatif ve DPP-IV önleyici etki verilerini içeren 1 SCI makalenin hazırlığı sürmektedir. 1 adet konferans özeti kabul edilmiş olup online formatta Ekim 2020'de uluslararası saygınlığı bulunan bir konferansta poster formatında sunulmuştur. Son olarak özellikle bulunan peptit dizilimlerini içeren bir patent başvurusunun PCT formatında hazırlığı devam etmektedir.

Bunlara ek olarak proje kapsamında 2 YL öğrencisinin (Ahmet Furkan Çağlar ve İnci Zent) tezi tamamlanmıştır. Üçüncü bir YL öğrencisinin (Ayşe Gülden Göksu) tezi de tamamlanma aşamasında olup 2021 yılından önce tez sunumunun yapılması planlanmaktadır. Projenin getirdiği olanaklar, tecrübe ve yeni yaklaşımlar sayesinde



ekibimizin yeni öğrencilere de bu değerli alanda değerli tecrübeler kazandırabileceği düşüncesindeyiz. Bu değerli katkılar dolayısıyla TÜBİTAK'a teşekkürü borç biliriz.



Kaynaklar Listesi ve Atıflar

1. Acay, H. 2018. "Yenilebilen yabani mantar *Morchella esculenta* (L.) Pers.'nin besinsel kalitesi ve biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesi", *Mantar Dergisi*, 9 (2), 95-105.
2. 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), 1256-62.
3. Agarwal, P., Gupta, R. 2016. "Alpha-amylase inhibition can treat diabetes mellitus", *Research and Reviews: Journal of Medical and Health Sciences*, 5, 1-8.
4. Agyei, D., Danquah, M.K. 2011. "Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides", *Biotechnology Advances*, 29, 272-277.
5. Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S. A., Najmi, A. K., Siddique, N. A., ... & Anwar, F. 2013. "A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(5), 337-352.
6. Ahren, B. 2007. "DPP-4 inhibitors", *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21(4), 517-533.
7. Ahsan, M.N., Watabe, S. 2001. "Kinetic and structural properties of two isoforms of trypsin isolated from the viscera of Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*", *Journal of Protein Chemistry*, 20(1), 49-58.
8. Aiking, H. 2011. "Future protein supply", *Trends in Food Science & Technology*, 22, 112-120.
9. Akev, N. 2019. "Proteinlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu", 2018-2019 Bahar Yarıyılı Farmasötik Biyoteknoloji Ders Notu s:14-22 URL: <https://aves.istanbul.edu.tr/ImageOfByte.aspx?Resim=8&SSNO=53&USER=590> Erişim:30.09.2019
10. Al-Gaby, A.M.A. 1998. "Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *N. sativa* (black cumin) cake protein", *Nahrung*, 42(5), 290-294.
11. Altınışik, M. 1998. "Amino asitler ve peptitler". 1998-1999 Eğitim-öğretim yılı tıp fakültesi 1.sınıf organik kimya ve biyokimya dersleri. S:1-18 URL:<https://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-06.pdf> Erişim:30.09.2019

12. Aluko, R. E. 2015. "Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides", *Current Opinion in Food Science*, 4, 44-50.
 13. Alupului, A., Calinescu, I, Lavric, V. 2009. "Ultrasonic vs. microwave extraction intensification of active principles from medicinal plants", *In Proceedings of the AIDIC Conference Series, Vol. 9*, pp. 1-8, İtalya.
 14. Al-Yahya, M.A. 1986. "Phytochemical studies of the plants used in traditional medicine of Saudi Arabia", *Fitoterapia*, 57(3), 179-82.
 15. Amri, E., Mamboya, F. 2012. "Papain, a plant enzyme of biological importance: A review", *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(2), 99-104.
 16. Anonim, 2014. "Proposal for new work on Codex Standart for Brown/Black Cumin (Whole and Ground), (prepared by India)", Joint FAO/ WHO Food Standards Programme.
 17. Anusha, R., Bindhu, O.S. 2016. "Bioactive peptides from milk, milk proteins- from structure to biological properties and health aspects", Isabel Gigli, IntechOpen, DOI: 10.5772/62993. URL:<https://www.intechopen.com/books/milk-proteins-from-structure-to-biological-properties-and-health-aspects/bioactive-peptides-from-milk> Erişim:10.09.2019
 18. AOAC, 2006, AOAC Official Method 950.46 Moisture in meat.
 19. AOAC, 1938, AOAC Official Method 938.08 Ash of seafood.
 20. Arcan, I., Yemenicioğlu, A. 2007. "Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans", *Food Chemistry*, 103 (2), 301-312.
 21. Arntfield, S.D. 2000. "Proteins from oil-producing plants", *Proteins in Food Processing*. s146-167, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, İngiltere.
-
22. Arrutia, F., Puente, Á., Riera, F.A., Menéndez, C., González, U.A. 2016. "Influence of heat pre-treatment on BSA tryptic hydrolysis and peptide release", *Food Chemistry*, 202, 40-48.
 23. Aspino, S.I., Horn, S.J., Eijssink, V.G.H. 2005. "Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera", *Process Biochemistry*, 40(5), 1957–66.
 24. 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.
 25. Ayhan, B. 2012. "*Nigella sativa* L. bitkisi üzerine fitoterapötik çalışmalar (Yüksek Lisans Tezi)", Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

26. Bandyopadhyay, K., Ghosh, S. 2002. "Preparation and characterization of papain modified sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolates", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6854-6857.
27. Barnett, A. 2006. "DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes", *International Journal of Clinical Practice*, 60(11), 1454-1470.
28. Başaran, E. 2015. "Fındıkta uygulanan ultrases ön işleminin fındık yağı verimine ve kalitesine etkisi", İstanbul Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
29. Baydar, H. 2009. "Science and technology of medicinal and aromatic plants", *Süleyman Demirel University, Faculty of Agriculture*.
30. Bayram, M.H. 2012. "Antihipertansif ilaç mekanizmaları", URL: <http://www.ivek.org.tr/calismalar/antihipertansif-ilac-mekanizmalari> Erişim tarihi:06.10.2019.
31. Beach, T.G. 2000. "The Cholinergic deficit coincides with ab deposition at the earliest histopathologicstages of Alzheimer disease", *Journal of Neuropathology Experimental Neurology*, 54(9), 308-313.
32. Becker, E.M., Nissen, L.S., Skibsted, L.H. 2004. "Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects", *European Food Research and Techonology*, 219(6), 561-571.
33. 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.
34. Bilişli, A. 2009. "Gıda kimyası", Sidas Yayıncılık, Çanakkale, s:100-120.
35. Bisswanger, H., Nouaimi, M., Klaus, M. 2001. "Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers", *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 567-574.
36. Bougatef, A., Hajji, M., Baltı, 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.
37. Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., Rajamohamed, S.H. 2010. "Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques", *Food Research International*, 43(2), 537-546

38. Bugg, T. 1996. "An introduction to enzyme and coenzyme chemistry", Blackwell Science, Oxford, İngiltere.
39. Burrell, M.M. 1993. "Enzymes of Molecular Biology", (Vol. 16, pp. 263-270). Humana Press, Totowa, NJ, ABD.
40. Butré, C.I., Sforza, S., Wierenga, P.A., Gruppen, H. 2015. "Determination of the influence of the pH of hydrolysis on enzyme selectivity of *Bacillus licheniformis* protease towards whey protein isolate", International Dairy Journal, 4, 44–53.
41. Ceran, D.G. 2018. Türkiye’de üretilen farklı fındık çeşitlerinin fındık zarı ve fındık küspesinin bileşimi, fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi", Mersin Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Mersin.
42. Chakrabarti, S., Guha, S., Majumder, K. 2018. "Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and Opportunities", Nutrients, 10(11), 1738.
43. Chakrabarti, S., Jahandideh, F., Wu, J. 2014. "Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress", BioMed Research International, Article ID 608979.
44. Chen, G. T., Zhao, L., Zhao, L.Y., Cong, T., Bao, S.F. (2007). "In vitro study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate", Journal of the Science of Food and Agriculture, 87 (2), 357-362.
45. Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. 1995. "Structural analysis of antioxidative peptides from soybean. beta.-Conglycinin", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43 (3), 574-578.
46. 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.
47. 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.
48. Cicero, A.F.G., Fogacci, F., Colletti, A. 2017. "Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review", British Journal of Pharmacology, 174, 1378–1394.
49. Clemente, A. 2000. "Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition", Trends in Food Science & Technology, 11(7), 254-262.

50. Cohen, L.W., Coghlan, V.M., Dihel, L.C. 1986. "Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA", *Gene*, 48, 219-227.
51. Contreras, M.D.M. vd. (2011). "Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology", *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 9–15.
52. 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.
53. 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.
54. Çakaloğlu, B., Özyurt, V.H., Ötleş, S. 2018. "Cold press in oil extraction (A review)", *Ukrainian Food Journal*, 7(4), 640-654.
55. Çakır, B., Gülseren, İ. 2019. "Identification of novel proteins from black cumin seed meals based on 2D gel electrophoresis and MALDI-TOF/TOF-MS analysis", *Plant Foods for Human Nutrition*, 74, 414–420.
56. Çetiner, M., Bilek, S.E. 2018. "Bitkisel protein kaynakları", *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 33(2), 111-126.
57. Çiftçi, H.S. 2018. "Fındık ve susam posalarından üretilen protein konsantrelerinin gıda ürünlerinde değerlendirilmesi". Namık Kemal Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ.
58. Çokgezen, J. 2007. "Avrupa Birliği Çevre Politikası ve Türkiye", *Marmara Üniversitesi İ.İ.B.F. Dergisi*, 23(2), 91-115.
59. Daliri, E.B.M., Oh, D.H., Lee, B.H. 2017. "Bioactive peptides", *Foods*, 6(5), 32.
60. Dando, W.A. 2012. "Food and famine in the 21st Century (2 volumes)", ABCCLIO, ABD.
61. Day, L. 2013. "Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security", *Trends in Food Science & Technology*, 32, 25-42.
62. 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.
63. Dinis, T.C., Madeira, V.M., Almeida, L.M. 1994. "Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315 (1), 161-169.

64. EC 2015. EU Action for the Circular Economy. 02.12.2015. EUR-Lex - 52015DC0614 – EN.
65. Edwin, F., Jagannadham, M.V. 2000. "Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state", *Biochemica et Biophysica Acta*, 1479, 69-82.
66. Edwin, F., Sharma, Jagannadham, M.V. 2002. "Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state", *Biochemica et Biophysica Acta*, 1479, 69-82.
67. 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.
68. Erickson, D.R. 2015. "Practical handbook of soybean processing and utilization", Elsevier, ABD.
69. Ermumcu, M.Ş.K., Şanlıer, N. 2017. "Black cumin (*Nigella sativa*) and its active component of thymoquinone: Effects on health". *Journal of Food and Health Science*, 3(4), 170-183.
70. Escamilla-Silva, E.M., vd. 2003. "Simplified process for the production of sesame protein concentrate. Differential scanning calorimetry and nutritional, physicochemical and functional properties", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 972–979.
71. Espejo-Carpio, F.J., Pérez-Gálvez, R., Guadix, E.M., Guadix, A. 2013. "Optimisation of the hydrolysis of goat milk protein for the production of ACE-inhibitory peptides", *The Journal of Dairy Research*, 80(2), 214.
72. FAO, I, 2013. "The State of Food Insecurity in The World 2013".
73. Fersht, A. 1998. "Structure and mechanism in protein science", Freeman and Company, ABD.
74. FitzGerald, R. J., Meisel, H. 2000. "Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme", *British Journal of Nutrition*, 84 (S1), 33-37
75. Frankel, E.N., Meyer, A.S. 2000. "The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.
76. Gao, Q., Smith, J.C., Tsopmo, A. 2014. "Optimized Protamex digested oat bran proteins: antioxidant properties and identification of new peptides", *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2(10), 1053.
77. Garcia, J. M., Agar, I.T., Streif, J. 1994. "Lipid characteristics of kernels from different hazelnut varieties", *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 18, 199-202.

78. Garcia, M.C., vd. 2013. "Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities", *Talanta*, 106, 328-349.
79. 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.
80. GE Healthcare, 2010. "Strategies for protein purification handbook (28-9833-31 AA)", İsveç.
81. Ghaly, A.E., Alkokaik, F.N. 2010. "Extraction of protein from common plant leaves for use as human food", *American Journal of Applied Sciences*, 7(3), 331- 342.
82. Gharby, S., vd. 2015. "Chemical investigation of *Nigella sativa* L. seed oil produced in Morocco", *Journal of Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14, 172-177.
83. Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C.G. 2004. "Angiotensin I -converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides", *International Journal of Dairy Technology*, 57, 172-188.
84. Gobbetti, M., Smacchi, E., Corsetti, A. 1996. "The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase", *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3220–6.
85. Goreja, W.G. 2003. "Black seed: nature's miracle remedy", New York, NY7 Amazing Herbs Press, ABD.
86. Gorinstein, S., vd. 2002. "Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears", *Journal of Science of Food and Agriculture*, 82, 1166-1170.
87. Görgüç, A. 2018. "Susam kepeğinden protein özütlenmesinde enzimin ve ultrases işleminin etkilerinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
88. 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.
89. 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, 2607-2614.

90. Gülseren, İ., 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), 3242-51.
91. Gürpınar, G.Ç., Geçgel, Ü., Taşan, M. 2011. "Soğuk presyon tekniği ile üretilen bitkisel yağların özellikleri ve sağlık üzerine etkileri", 7. Gıda Mühendisliği Kongresi 2011, Ankara.
92. Haddad, P.R., Jackson, P.E. 1990. "Ion Chromatography: principles and applications", In: *Journal of Chromatography Library - Volume 46*, Elsevier, pp. 1-28, Amsterdam, Hollanda.
93. Hadi, M.Y., Mohammed, G.J., Hameed, I.H. 2016. "Analysis of bioactive chemical compounds of *Nigella sativa* using gas chromatography mass spectrometry", *Journal of Pharmacognosy Phytotherapy*, 8(2), 8–24.
94. 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.
95. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1990. "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview", *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
96. Hanafy, M.S.M., Hatem, M.E. 1991. "Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin)", *Journal of Ethnopharmacology*, 34(2– 3), 275–278.
97. Hanmoungjai, P., Pyle, D.L., Niranjana, K. 2001. "Enzymatic process for extracting oil and protein from rice bran", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(8), 817-821.
98. Hanmoungjai, P., Pyle, D.L., Niranjana, K. 2001. "Enzymatic process for extracting oil and protein from rice bran", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(8), 817-821.
99. 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.
100. Hartmann, R., Meisel, H. 2007. "Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications", *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163-169.
101. Hassanien, M.F., Assiri, A.M., Alzohairy, A.M., Oraby, H.F. 2015. "Health-promoting value and food applications of black cumin essential oil: an overview", *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6136-42.

102. 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.
103. 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.
104. Holst, J.J., Gromada, J. 2004. "Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans", *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 287(2), E199-E206.
105. Hourigan, J.A., Chesterman, C.F. 1997. "Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(2), 141-146.
106. Huang, Q., Li, S.G., Teng, H., Jin, Y.G., Ma, M.H., Song, H.B. 2015. "Optimizing preparation conditions for Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of ovalbumin", *Food Science and Biotechnology*, 24(6), 2193-98.
107. 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.
108. Hüriyet, Z. 2014. "Soğuk presten çıkan kapyra biber tohumu unlarından protein izolasyonu ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
109. İmer, Y., Taşan, M. 2018. "Çeşitli soğuk pres yağların bazı mikro ve makro element içeriklerinin belirlenmesi", *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(1), 14-25.
110. Jia, C.L., Hussain, N., Obaroakpo, J.U., 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*, 126333.
111. Jiao, J., Li, Z.G., Gai, Q.Y., Li, X.J., Wei, F.Y., Fu, Y.J., Ma, W. 2014. "Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities", *Food Chemistry*, 147, 17-24.
112. 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.

113. Kanu, P. J., Kerui, Z., Ming, Z. H., Haifeng, Q., Kanu, J. B., & Kexue, Z. (2007). "Sesame Protein 11: Functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolate as influenced by pH, temperature, time and ratio of flour to water during its production", *Asian Journal of Biochemistry*, 2(5), 289-301.
114. Karaca, A.C., Low, N., Nickerson, M. 2011. "Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction", *Food Research International*, 44(9), 2742-2750.
115. Keil, B. 1971. "8 Trypsin", *In The enzymes* (Vol. 3, pp. 249-275). Academic Press.
116. Khiari, Z., Ndagijimana, M., Betti, M. 2014. "Low molecular weight bioactive peptides derived from the enzymatic hydrolysis of collagen after isoelectric solubilization/precipitation process of turkey by-products", *Poultry Science*, 93, 2347-2362.
117. Kim, S.K., Wijesekara, I. 2010. "Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review", *Journal of Functional Foods*, 2(1): 1-9.
118. Koçancı, F.G., Aslım, B. 2016. "Structure and functions of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase inhibitory activity of plants", *Manas Journal of Agriculture and Life Science*, 6(1), 19-35.
119. Konak, Ü.İ., Turhan, İ., Certel, M. 2014. "Proteinlerin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması", *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 12 (2), 79-87.
120. Köksal A.İ., Artik, N., Şimşek, A., Güneş, N. 2006. "Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey", *Food Chemistry*, 99, 509-515.
121. Krajcovicova-Kudlackova, M., Babinska, K., Valachovicova, M. 2005. "Health benefits and risks of plant proteins", *Bratislavske Lekarske Listy*, 106(6/7), 231.
122. Lacroix, I.M., Li-Chan, E.C. 2012a. "Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an *in silico* approach", *Journal of Functional Foods*, 4(2), 403-422.
123. Lacroix, I.M., Li-Chan, E.C. 2012b. "Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates", *International Dairy Journal*, 25(2), 97-102.
124. 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.

125. Lamsal, B.P., Jung, S., Johnson, L.A. 2007. "Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis", *LWT-Food Science and Technology*, 40(7), 1215-1223.
126. Lee, S.Y., Hur, S.J. 2017. "Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants", *Food Chemistry*, 228, 506–517.
127. Lemes, A.C., Sala, L., Ores, J.D.C., Braga, A.R.C., Egea, M.B., Fernandes, K. F. 2016. "A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste", *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 950.
128. 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.
129. Li, Y., Yu, J. 2015. "Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides", *Journal of Medicinal Food*, 18, 147–156.
130. Li, G.H., Le, G.W., Liu, H., Shi, Y.H. 2005. "Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity", *Food Science and Technology International*, 11(4), 281-287.
131. Liang, H.N., Tang, C.H. 2013. "pH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins", *Food Hydrocolloids*, 33, 309-319.
132. 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.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. Madej, K. 2009. "Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds", *Trends in Analytical Chemistry*, 28(4), 436-446.

137. Majumder, K., Chakrabarti, S., Morton, J.S., Panahi, S., Kaufman, S., Davidge, S.T., Wu, J. 2015. "Egg-derived ACE-inhibitory peptides IQW and LKP reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats", *Journal of Functional Foods*, 13, 50–60.
138. Malmsten, M., Larsson, A. 2000. "Immobilization of trypsin on porous glycidyl methacrylate beads: effects of polymer hydrophilization", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18, 277-284.
139. 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.
140. Marugg, J. D., Meijer, W., van Kranenburg, R., Laverman, P., Bruinenberg, P. G., De Vos, W.M. 1995. "Medium dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: control of transcription initiation by specific dipeptides", *Journal of Bacteriology*, 177(11), 2982–2989.
141. Matthews, B.W., Sigler, P.B., Henderson, R., Blow, D.M. 1967. "Three-dimensional structure of tosyl- α -chymotrypsin", *Nature*, 214(5089), 652-656.
142. Matthous, B., Brühl, L. 2003. "Quality of cold-pressed edible rapeseed oil in Germany", *Food*, 47(6), 413-419.
143. 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), 2147-63.
144. Meisel, H. 1993. "Casokinins as inhibitors of angiotensin-converting enzyme", *New Perspectives in Infant Nutrition*, 153-159.
145. Meisel, H., Fitzgerald, R.J. 2003. "Biofunctional peptides from milk proteins; mineral binding and cytomodulatory effects", *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1289-1295.
146. Menard, R., Khouri, H.E., Plouffe, C., Dupras, R., Ripoll, D., Vernet, T., ... & Storer, A.C. 1990. "A protein engineering study of the role of aspartate 158 in the catalytic mechanism of papain", *Biochemistry*, 29(28), 6706-6713.
147. Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... & Dufour, C. 2014. "A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus", *Food & Function*, 5(6), 1113-1124.
148. Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., Darewicz, M. 2008. "BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences", *Journal of AOAC International*, 91(4), 965-980.

- 149.** Mojica, L., Mejía, E.G. 2017. "Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins, their characterization and biological potential", *Food Functionality*, 7, 713–727.
- 150.** 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.
- 151.** 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.
- 152.** Morales-Polanco, E., Campos-Vega, R., Gaytán-Martínez, M., Enriquez, L. G., & Loarca-Piña, G. 2017. "Functional and textural properties of a dehulled oat (*Avena sativa* L) and pea (*Pisum sativum*) protein isolate cracker", *LWT-Food Science and Technology*, 86, 418-423.
- 153.** Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., Parajó, J.C. 2006. "Functionality of oilseed protein Functionality of oilseed protein products: a review", *Food Research International*, 39(9), 945-963.
- 154.** 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.
- 155.** 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.
- 156.** Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano, T. 1995. "Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk", *Journal of Dairy Science*, 78(4), 777-783.
- 157.** Nauck, M., Frid, A., Hermansen, K., Shah, N.S., Tankova, T., Mitha, I.H., ... & Matthews, D.R. 2009. "Efficacy and safety comparison of liraglutide, glimepiride, and placebo, all in combination with metformin, in type 2 diabetes: the LEAD (liraglutide effect and action in diabetes)-2 study", *Diabetes Care*, 32(1), 84-90.
- 158.** Nguyen, H.Q., Dao, D.T.A. 2017. "Release bioactive peptides from soybean by optimization the enzymatic hydrolysis by alcalase and protamex using response surface methodology", *Vietnam Journal of Science and Technology*, 55(2), 137.

159. Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C. 2001. "Improved method for determining food protein degree of hydrolysis", *Journal of Food Science*, 66(5), 642-646.
160. NMKL, 2003, "Nordic Committee on Food Analysis-Nitrogen, Determination in foods and feeds according to Kjeldahl".
161. Nongonierma, A.B., Mazzocchi, C., Paoella, S., FitzGerald, R.J. 2017. "Release of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from milk protein isolate (MPI) during enzymatic hydrolysis", *Food Research International*, 94, 79-89.
162. Nongonierma, A.B., Paoella, 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.
163. Ohata, M., Uchida, S., Zhou, L., Arihara, K. 2016. "Antioxidant activity of fermented meat sauce and isolation of an associated antioxidant peptide", *Food Chemistry*, 194, 1034-1039.
164. Ohshima, T., Sato, M., Saito, M. 1995. "Selective release of intracellular protein using pulsed electric field", *Journal of Electrostatics*, 35(1), 103-112.
165. Oktay, M., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ. 2003. "Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts", *LWT-Food Science and Technology*, 36 (2), 263-271.
166. Ondetti, M.A., Cushman, D.W. 1982. "Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors", *Annual Review of Biochemistry*, 51(1), 283-308.
167. Orhan, G., Orhan, I., Sener, B. 2006. "Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease", *Letters in Drug Design and Discovery*, 3, 268-274.
168. Oroian, M., Escriche, I. 2015. "Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis", *Food Research International*, 74, 10-36.
169. Özdemir, F., Akinci, I. 2004. "Physical and nutritional properties of four major commercial Turkish hazelnut varieties", *Journal of Food Engineering*, 63(3), 341-347.
170. Özdemir, M. 1997. "Critical evaluation of properties of Turkish hazelnuts", *Gıda Teknolojisi*, 10, 1-9.

171. Padhye, S., Banerjee, S., Ahmad, A., Mohammad, R., Sarkar, F.H. 2008. "From here to eternity-the secret of pharaohs: therapeutic potential of black cumin seeds and beyond", *Cancer Therapy*, 6, 495-510.
172. Patil, P., Mandal, S., Tomar, S.K., Anand, S. 2015. "Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes", *European Journal of Nutrition*, 54(6), 863-880.
173. Paul, B., Nasreen, M., Sarker, A., Islam, M.R. 2013. "Isolation, purification and modification of papain enzyme to ascertain industrially valuable nature", *International Journal of Bio-Technology and Research*, 3(5), 11-22.
174. Pedroche, J., Yust, M.M., Lqari, H., Megias, C., Giron-Calle, J., Alaiz, M., ... & Millan, F. 2007. "Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases", *Food Research International*, 40(7), 931-938.
175. 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.
176. Perona, J.J., Craik, C.S. 1995. "Structural basis of substrate specificity in the serine proteases", *Protein Science*, 4(3), 337-360.
177. Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., Korhonen, H. 2000. "Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides", *Journal of Dairy Research*, 67(1), 53-64.
178. Pimentel, D., Dritschilo, W., Krummel, J., Kutzman, J. 1975. "Energy and land constraints in food protein production", *Science*, 190(4216), 754-761.
179. Pimentel, D., Pimentel, M. 2003. "Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment", *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 660-663.
180. 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.
181. Pisoschi, A.M., Pop, A. 2015. "The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
182. Pleissner, D., Lin, C.S.K. 2013. "Valorisation of food waste in biotechnological processes", *Sustainable Chemical Processes*, 1, 21.

- 183.** Pohl, C.A., Stillian, J.R., Jackson, P.E. 1997. "Factors controlling ion-exchange selectivity in suppressed ion chromatography", *Journal of Chromatography A*, 789(1-2), 29-41.
- 184.** Polychroniadou, A. 1988. "A simple procedure using trinitrobenzenesulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese", *Journal of Dairy Research*, 55(4), 585-596.
- 185.** Potter, N., Hotchkiss, 1995. *Food Science*, 5th edn. Springer Sciences Business Media, New York, NY, ABD.
- 186.** 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.
- 187.** Rawlings, N.D., Barrett, A.J. 1995. "Evolutionary families of metallopeptidases", *In Methods in Enzymology* pp. 183-228, Academic Press.
- 188.** Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C. 1996. "Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation", *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039.
- 189.** Robert, A.M., Dann, L., Lown, G. 1974. "The specificity of the S'1 subsite of papain", *Journal of Biochemistry*, 141, 495-501.
- 190.** Rodrigues, I.M., Coelho, J.F.J., Carvalho, G.V.S. 2012. "Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential", *Journal of Food Engineering*, 109, 337-346.
- 191.** Rodsamran, P., Sothornvit, R. 2018. "Physicochemical and functional properties of protein concentrate from by-product of coconut processing", *Food Chemistry*, 241, 364-371.
- 192.** Romero-Baranzini, A.L., Yanez-Farias, G.A., Barron-Hoyos, J.M. 1995. "A high protein product from chickpeas (*Cicer arietinum* L.) by ultrafiltration, preparation and functional properties", *Journal of Food Processing and Preservation*, 19, 319-329.
- 193.** Roselló-Soto, E., Barba, F.J., Parniakov, O., Galanakis, C.M., Lebovka, N., Grimi, N., Vorobiev, E. 2015. "High voltage electrical discharges, pulsed electric field, and ultrasound assisted extraction of protein and phenolic compounds from olive kernel", *Food and Bioprocess Technology*, 8(4), 885-894.
- 194.** Rostika, R., Sunarto, S.H., Dewanti, L.P. 2018. The effectiveness of crude papain enzyme supplement for tilapia's (*Oreochromis niloticus*) growth at the

floating nets of Cirata Reservoir. *In* IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 139, No. 1, p. 012006).

- 195.** Ruiz, J.Á.G., Ramos, M., Recio, I. 2004. "Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion", *International Dairy Journal*, 14(12), 1075-1080.
- 196.** Salampessy, J., Reddy, N., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2017). "Isolation and characterization of nutraceutically potential ACE inhibitory peptides from leatherjacket (*Meuschenia* sp.) protein hydrolysates", *LWT-Food Science and Technology*, 80, 430-436.
- 197.** Sandberg, A.S. 2011. "Developing functional ingredients: a case study of pea protein", M. Saarela (Ed.), 358-382, Woodhead Publishing Ltd.
- 198.** Sangsawad, P., Roytrakul, S., Yongsawatdigul, J. 2017. "Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from the simulated *in vitro* gastrointestinal digestion of cooked chicken breast", *Journal of Functional Foods*, 29, 77–83.
- 199.** Sari, Y.W., Mulder, W.J., Sanders, J.P., Bruins, M.E. 2015. "Towards plant protein refinery: review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance", *Biotechnology Journal*, 10(8), 1138-1157.
- 200.** Sarkis, J.R., Boussetta, N., Blouet, C., Tessaro, I.C., Marczak, L.D.F., Vorobiev, E. 2015. "Effect of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on polyphenol and protein extraction from sesame cake", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 170-177.
- 201.** Sarmadi, B.H., Ismail, A. 2010. "Antioxidative peptides from food proteins: a review", *Peptides*, 31(10), 1949–56.
- 202.** Sastre, J., Pallardo, F.V., Vina, J. 2000. "Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis", *IUBMB Life*, 49, 427–435.
- 203.** Savoie, R., Lanoiselle, J.L., Vorobiev, E. 2013. "Mechanical continuous oil expression from oilseeds: A review", *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 1-16.
- 204.** Savran, H.E. (2014). *Fındığın Tarihçesi.*, URL: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/findik> Erişim:10.10.2019
- 205.** Scopes, R.K., 2000. "Protein Separation", *In* Encyclopedia of Separation Science, M. Cooke and C.F. Poole (Editors), Academic Press, pp. 405-410, ABD.

- 206.** Sebokova, E., Christ, A.D., Boehringer, M., Mizrahi, J. 2007. "Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: the next generation of new promising therapies for the management of type 2 diabetes", *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(6), 547-555.
- 207.** Sheehan, D., Fitzgerald, R. 2008. "Ion-Exchange Chromatography", *In Molecular Biomethods Handbook*, R. Rapley and J.M. Walker (Editors), Humana Press, pp. 445-449, New Jersey, NJ, ABD.
- 208.** 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.
- 209.** Sikirić, M., Brajenović, N., Pavlović, I., Havranek, J. L., & Plavljančić, N. (2003). "Determination of metals in cow's milk by flame atomic absorption spectrophotometry", *Czech Journal of Animal Science*, 48(11), 481-486.
- 210.** Silaharoglu, S., Güngör, S.S.U., İlçim, A., Kökdil, G. 2014. "Fatty acid, tocopherol, mineral composition, total phenolic, flavonoid and thymoquinone content, and antioxidant potential of *Nigella stellaris*", *European Journal of Chemistry*, 5(2), 263-266.
- 211.** Singh, J., Bagale, P.C. 2000. "Development of a small capacity double stage compression cold press for oil expression", *Journal of Food Engineering*, 43(2), 75-82.
- 212.** Singh, P. 2011. "Antioxidant activity of food proteins and food protein hydrolysates", Yüksek Lisans Tezi, McGill Üniversitesi, Montreal, QB, Kanada.
- 213.** Singharaj, S., Onsaard, E. 2015. "Production and characteristics of sesame proteins", *Journal of Food Science and Agricultural Technology*, 1(1), 188-192.
- 214.** 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.
- 215.** Sobutay, T. 2006. "Fındık Sektör Araştırması", İstanbul Dış Ticaret Odası Dış Ticaret Şubesi Uygulama Şubesi, İstanbul, 20s. URL: <https://www.yumpu.com/tr/document/read/23254946/fndk-sektor-arastmas-ito>
Erişim:10.10.2019
- 216.** Soholm, B. 1998. "Clinical improvement of memory and other cognitive functions by *Ginkgo biloba*: Review of relevant literature", *Advances in Therapy*, 15, 54-65.

- 217.** Song, Y., Huang, Z., Song, Y., Tian, Q., Liu, X., She, Z., ... Deng, Y. 2014. "The application of EDTA in drug delivery systems: doxorubicin liposomes loaded via NH₄EDTA gradient", *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3611-3621.
- 218.** Şenol, F.S., Orhan, I., Celep, F., Kahraman, A., Doğan, M., Yılmaz, G., Şener, B. 2010. "Survey of 55 Turkish *Salvia taxa* for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities", *Food Chemistry*, 120, 34-43.
- 219.** 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.
- 220.** Tatar, F., Tunç, M.T., Kahyaoglu, T. 2013. "Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.) protein concentrates: functional and rheological properties", *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 1024-1031.
- 221.** 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.
- 222.** Topkaya, C. 2017. "Nar kabuğu tozu ilavesinin keklerin besinsel, duyuusal ve mikrobiyolojik özelliklerine etkisi", Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- 223.** Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., Vioque, J. 2011. "Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates", *Food Chemistry*, 129, 485-490.
- 224.** Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., Vioque, J. 2012. "Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides", *Food Chemistry*, 134(3), 1585-1588.
- 225.** 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.
- 226.** TSE, 2020, TS EN 660.2020 Official Method, Animal and vegetable fats and oils – determination of acid value and acidity.
-
- 227.** Tuna, H.E. 2015. "Gıda atığı olan vişne, nar, kabak ve kayısı çekirdeklerinin kek üretiminde değerlendirilmesi", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- 228.** Tüfekçi, F. 2018. “Karadeniz bölgesinde yetiştirilen fındıkların yağ asitleri kompozisyonunun araştırılması”, İstanbul Aydın Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul.
- 229.** 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.
- 230.** Ulagesan, S., Kuppusamy, A., Kim, H.J. 2018. “Antimicrobial and antioxidant activities of protein hydrolysate from terrestrial snail *Cryptozona bistrialis*”, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(12), 12-19.
- 231.** Ustaoglu, B. (2012). The effect of climatic conditions on hazelnut (*Corylus avellana*) yield in Giresun (Turkey). *Marmara Coğrafya Dergisi* sayı: 26, 302-323.
- 232.** Ünal, M.Ü., Şener, A., Cemek, K. 2018. “Biyoaktif peptitlerin sağlık üzerine etkileri”, *GIDA*, 43(6), 930-942.
- 233.** Ünlüsayın, M., Erdilal, R., Çagatay, T. 2009. “Balık proteinlerinin saflastırılmasında kullanılan son yöntemler/The recent methods on using for purification of fish proteins”, *Journal of Fisheries Sciences*, 3(4), 298.
- 234.** 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.
- 235.** Vatansev, H., Ciftci, H., Ozkaya, A., Ozturk, B., Evliyaoglu, N., Kiyici, A. 2013. “Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds used as a medical aromatic plant from East Anatolia Region, Turkey”, *Asian Journal of Chemistry*, 25(10), 5490-5492.
- 236.** Veral, E.S., Yiğitbaşıoğlu, S. 2018. “Avrupa Birliği atık politikasında atık yönetiminden kaynak yönetimi yaklaşımına geçiş yönelimleri ve döngüsel ekonomi modeli”, *Ankara Üniversitesi Çevrebilimleri Dergisi*, 6(1), 1-19.
- 237.** Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W. 2004. “Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides”, *British Journal of Nutrition*, 92(3), 357-366.
- 238.** Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Moyá, M.L., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. 2007. “Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical”, *Talanta*, 71(1), 230-235.

- 239.** Walsh, K.A. 1970. “[4] Trypsinogens and trypsins of various species”, *In Methods in Enzymology* (Vol. 19, pp. 41-63), Academic Press.
- 240.** Wang, L., Weller, C.L. 2006. “Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants”, *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- 241.** 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.
- 242.** Whitford, D. 2005. “Protein expression, purification and characterization”, *In Proteins: Structure and Function*, John Wiley & Sons, pp. 313-346, İngiltere.
- 243.** 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.
- 244.** Yağcı, S., Altan, A., Göğüş, F., Maskan, M. 2006. “Gıda atıklarının alternatif kullanım alanları”, *Türkiye 9. Gıda Kongresi 2006*. Bolu, s24-26.
- 245.** Yaron, A., Naider, F., Scharpe, S. 1993. “Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins”, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28(1), 31-81.
- 246.** Young, V.R., Pellett, P.L. 1994. “Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(5), 1203-1212.
- 247.** 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.
- 248.** Zent, İ., Göksu, A. G., Çakır, B., Gülseren, İ. 2020. “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*, <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00666-z>.
- 249.** 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.
- 250.** Zuorro, A., Lavecchia, R., Medici, F., Piga, L. 2014. “Use of cell wall degrading enzymes for the production of high-quality functional products from tomato processing waste”, *Chemical Engineering Transactions*, 38, 355-360.

EK-1



LC-Q-TOF/MS based identification and in silico verification of ACE-inhibitory peptides in Giresun (Turkey) hazelnut cakes

Ahmet Furkan Çağlar¹ · Bilal Çakır^{2,3} · İbrahim Gülseren^{1,4}

Received: 20 October 2020 / Revised: 28 January 2021 / Accepted: 31 January 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2021

Abstract

Hazelnut (*Corylus avellana* L.) cakes represent are a rich source of proteins. In an effort to valorize industrially cold-pressed hazelnut cakes, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory characteristics of hazelnut protein hydrolysates were evaluated. Trypsin, chymotrypsin and thermolysin hydrolysates of hazelnut protein isolates were fractionated using Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC). The hydrolysate fractions were tested for ACE inhibitory characteristics and inhibitor peptide identification was based on Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC-Q-TOF/MS). Finally, in vitro ACE inhibitory activity was verified using in silico tools. In all cases, some hydrolysate fractions demonstrated ACE inhibitory characteristics, while inhibitory activity widely varied (7–95%) depending on proteolysis conditions. In ACE inhibitory fractions, 179 different peptides were identified. Their potential inhibitory activity was verified in silico for 22 different peptides generated by thermolysin, 3 for chymotrypsin and 4 for trypsin. While the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) (0.13–4.83 mg ml⁻¹) values were comparable to the previous literature, currently identified sequences were different than ACE inhibitory peptides purified from Asian hazelnuts. The peptides with the highest PeptideRanker scores for each treatment (i.e., SPLAGR, VPHW and PGHF) were studied for their potential ACE binding, Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity (ADMET) and circulatory half-life characteristics demonstrating limited pharmacokinetic interference, low toxicity as well as comparable short circulation and stronger binding compared to a reference inhibitor peptide (i.e., VPP). Geographical attributes and proteolytic treatments could have a bearing on ACE inhibitory potential of peptides, while hazelnut cakes can be regarded as a valuable resource for ACE inhibitor peptides.

Keywords Hazelnut protein hydrolysates · Hydrolysate fractions · Valorization · LC-Q-TOF/MS · Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity · Bioactive peptides

Abbreviations

ACE Angiotensin-converting enzyme
ADMET Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity
FPLC Fast protein liquid chromatography

IC₅₀ Half maximal inhibitory concentration
LC-Q-TOF/MS Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry
TNBS 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid

✉ İbrahim Gülseren
ibrahim.gulseren@izu.edu.tr

¹ Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Natural Sciences, İstanbul Sabahattin Zaim University (İZÜ), 34303 Halkalı – Küçükçekmece, İstanbul, Turkey

² Halal Food R&D Center, İstanbul Sabahattin Zaim University (İZÜ), Halkalı, Küçükçekmece, İstanbul, Turkey

³ Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Marmara University, Institute of Health Sciences, Başbüyük, Maltepe, İstanbul, Turkey

⁴ İZÜ Food and Agricultural Research Center (GTAUM), Halkalı Campus, 34303 Küçükçekmece, İstanbul, Turkey

Introduction

The World Health Organization (WHO) predicted that heart disease-related mortalities were to become the most common cause of death globally by 2020 [1]. Hypertension can be considered as one of the controllable risk factors associated with myocardial infarction, heart failure and renal failure [2]. Approximately 131 billion USD are being spent on hypertension-lowering drugs in the United States each year [2].

Consequently, anti-hypertensive peptides from animal or plant origin have been commonly investigated [3].

Various bioactive peptides have been obtained from food products, such as eggs, rice, spinach, and peas, and demonstrated varying levels of anti-hypertensive activity [4]. Bioactive peptides demonstrate high affinity to tissues with reduced likelihood of side effects compared to the synthetic drugs [1]. Studies on the discovery and utilization of cheaper and safer alternatives are being intensely carried out. Bioavailability of peptides, however, could be limited due to degradation in human body across the gastrointestinal tract. Furthermore in some cases, due to relatively large size or hydrophobicity of peptides, their ability to permeate through epithelium might be negatively affected [5, 6].

Angiotensin I-converting enzyme (ACE) is a critical enzyme in the renin–angiotensin system. ACE converts the angiotensin I hormone to angiotensin II, which is a vasoconstrictor. It also degrades the vasodilator peptide known as bradykinin. Both mechanisms potentially lead to increasing blood pressure in humans [7, 8], while ACE inhibitory peptides could prevent hypertension in humans.

Hazelnuts (*Corylus avellana* L.) are among the major agricultural products of Turkey, where approximately 80% of the global hazelnut harvest is collected (roughly 550,000 tonnes per year) [9]. The capacity of cold-pressed hazelnut oil production is increasing which generates increasing extents of deoiled hazelnut cake that can be valorized. Although the literature is rich on hazelnut consumption-related allergies including protein-based allergens [10–12], and there are some data on the technical functionality of hazelnut proteins [13, 14], the data on bioactive characteristics of hazelnut proteins [14] and their hydrolysates [15] are limited.

Based on the studies of Liu et al. [16], Asian hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.) proteins were hydrolyzed using Alcalase and the most intensely ACE inhibitory peptides were reported to be AVKVL, YLVR and TLVGR, which mostly consisted of hydrophobic and basic residues. The latter two were characterized by a C-terminal basic residue (i.e., arginine), which is a common observation for many ACE inhibitory peptides.

In our recent studies, 23 hazelnut proteins were analyzed *in silico* for their bioactive characteristics and ACE inhibitory activity was predicted to be among the 2 most likely bioactivities in these hydrolysates [17]. Consequently, we conducted a preliminary study on the trypsinolysis of hazelnut protein concentrates which lead to moderate ACE inhibitory activity [18]. Here, enhancement of ACE inhibitory activities of hazelnut protein hydrolysates was targeted using multiple proteases with different catalytic capabilities and FPLC-based fractionation techniques for this commercially critical commodity (Giresun tombul hazelnuts).

Materials and methods

Materials

Cold-press de-oiled hazelnut (*Corylus avellana* L., Giresun, Turkey, “tombul” hazelnuts) cakes were provided by a local company (Neva Foods Ltd., İstanbul, Turkey). All chemicals were purchased from Sigma Chemical Corp.

Manufacture of hazelnut protein isolates

Protein extraction from cold-press de-oiled hazelnut cakes (approx. 50% protein as determined by a Dumas analysis technique) was based on the alkaline extraction-isoelectric precipitation (AE-IP) technique. Protein solubilization was facilitated via the increased surface charges of proteins at basic pH, which was followed by the isoelectric precipitation at low pH as previously described [19].

Proteolytic hydrolysis

Trypsin, chymotrypsin and thermolysin were separately used for enzymatic hydrolysis of hazelnut proteins isolates (approx. 94.8% protein as determined by a Dumas analysis technique). Aqueous dispersions of proteins (20 mg ml⁻¹) were prepared in appropriate 20 mM Tris–HCl buffer solutions. Proteases were added to protein solutions at an enzyme:substrate ratio of 1:100 for trypsin and chymotrypsin (pH 7.4), and 1:50 for thermolysin (pH 8) [20]. The enzymatic process was continued overnight at a mixing rate of 1000 rpm at 37 °C. Immediately afterwards, trypsin and chymotrypsin hydrolysates were inactivated at 95 °C (5 min). For the inhibition of thermolysin, 0.5% formic acid was added to the hydrolysates. For the proteolytic hydrolysates, protein concentration was determined using a Lowry method-based technique [21].

Determination of degree of hydrolysis (% DH)

Degree of hydrolysis was determined based on the 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) method [22]. The leucine amino equivalency was determined based on Nielsen et al. [23].

Fractionation of hydrolysates

Hydrolyzed hazelnut proteins were fractionated using AKTA-Pure 25-L1 fast protein liquid chromatography (FPLC) system (GE Healthcare, UK). HiTrap Capto Q anion exchange columns were utilized for fractionation (GE Healthcare). Hydrolysate samples were injected into

the column at a rate of 1 CV min⁻¹. Salt containing 20 mM Tris–HCl buffer (0.6 M NaCl, pH 8.3) was used for the elution of the column-bound compounds. The elution was carried out utilizing a 0–0.6 M NaCl linear gradient over 32 CV. Each and every 2 CV was collected as a separate fraction and numbered sequentially. Prior to Capto Q experiments, a variety of other ion exchange (HiTrap DEAE FF, Capto DEAE, Capto-S) and hydrophobic interaction (HiTrap Phenyl FF, HiTrap Butyl-S FF, HiTrap Octyl FF) columns were tested in pre-trials.

Measurement of ACE inhibitory activity

ACE inhibition in fractions was calculated as a function of the decrease in hippuric acid (HA) in comparison to the control sample and % inhibition values were calculated [24]. Briefly, salt concentrations of peptide fractions in 20 mM Tris–HCl buffer were adjusted to contain approximately 0.6 M NaCl. 1.68 mU of 250 µl ACE and 250 µl peptide fractions prepared in sodium borate buffer (0.1 M, pH 8.3) were mixed and pre-incubated in the thermomixer for 5 min to ensure thermal equilibrium at 37 °C. After the incubation, 3.94 mM HHL (15 µl) was added to the mixture and the reaction was continued for 1 h. Immediately afterwards, 1 M HCl (500 µl) was added to the mixture to stop the reaction. % ACE inhibition was monitored at 228 nm by injecting 10 µl of this mixture directly into the HPLC column (Ascentis C18 Column, 4.6 mm ID × 250 mm, 5 µm particle diameter, Supelco). TFA (0.1%) prepared in 50% methanol was used as the mobile phase. The isocratic flow rate was 0.6 ml per min and 20 mM Tris–HCl buffer containing 0.6 M NaCl was used as the control. In addition, captopril, a well-known ACE inhibitor, was used as a positive control at a concentration level of 0.05 µM.

Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-TOF/MS) analysis of ACE inhibitory fractions

All MS analyses were carried out using the default settings of Labmed, Acıbadem University, İstanbul, Turkey, using a Xevo G2-XS QToF (Waters) device.

Samples treated with different proteases were incubated with 10 mM DTT at 55 °C for 10 min to ensure the reduction of the peptides. The reduced peptide mixtures were then alkylated with 20 mM iodoacetamide (IAA) in the dark at ambient temperature conditions. Samples were filtered through 30 kDa filters. Peptide concentration of the samples was determined and the samples were taken into vials for LC-Q-TOF/MS analysis at 1 mg per injection.

LC separation was based on an HSS T3 Column (1.8 µm, 2.1 × 150 mm), detection wavelength of 214 nm and a column temperature of 60 °C. A flow rate of 0.2 ml min⁻¹ was

administered. MS conditions were based on a sample cone voltage of 80 V, source temperature of 120 °C, desolvation temperature of 300 °C and desolvation gas flow rate of 800 l h⁻¹.

Prior to the analyses, the detector and calibration settings were made via MassLynx program specific to the Xevo G2-XS QToF device where the analyses were performed. The peptide fractions were further fractionated with an acetonitrile gradient (5–35%) in an HSS T3 column based on their hydrophobicity and the separated peptides were analyzed by mass spectrometry upon electrospray ionization. MS analysis was performed for 0.7 s and information was collected about the entire peptide. Afterwards, MS/MS analysis was performed for 0.7 s and the peptide fragmentation and sequence information were obtained. For protein identification, appropriate protein databanks were used for each sample.

Peptides and proteins were identified using ProteinLynx Global Server (PLGS 3.0) software. Analysis was performed using the appropriate databank for each sample type. “False positive rate” was set to 1%. Further details are not presented here to ensure brevity.

In silico analyses

The determined peptide sequences were analyzed in silico for their physicochemical and bioactive characteristics [25–29] including isoelectric point, charge, and toxicity [25], probability of being bioactive [26, 27], the interactions with ACE [28] and ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity) properties [29]. In silico verification of peptide bioactivity was based on the PeptideRanker score [27].

Consequently, the primary in silico tool utilized here was PeptideRanker to assess bioactive potential of peptides [27]. The main hypothesis behind the PeptideRanker algorithm is that assessing the general characteristics of bioactive peptides could assist in the elucidation of novel bioactive peptides based on the use of general predictors. Essentially, PeptideRanker score is based on structural homology between peptides. While PepSite2 method depends on the calculation of protein–peptide-binding characteristics from a set of known protein–peptide 3D structures, and distance constraints that were derived from previously characterized peptides [28]. ToxinPred combines machine learning and quantitative matrix modelling approaches and utilizes them along with the toxicity behavior previously characterized toxic and non-toxic sequences [25].

Isoelectric point, charge, and toxicity attributes of the peptides were investigated using the “Batch submission” tool on ToxinPred website (https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/multi_submit.php) [25]. PeptideRanker score for multiple peptides can be determined simultaneously on

<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker> website [26]. Potential ACE inhibitory activity of the peptides was also verified by BIOPEP “Calculations” tool (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) [27]. Using the appropriate PDB code for human ACE and potentially interacting peptide sequences, peptide-binding sites on ACE surface were determined (<http://pepsite.russelllab.org/>) [28]. ADMET tool on <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar1/predict/> was utilized to predict the ADMET properties of the potentially bioactive peptides [29].

Using a molecular docking approach, peptide–protein interactions were also studied via HPEPDOCK, which generated docking scores and 3D protein–peptide interaction images [30]. Finally, using PLIFEPRED, half-life of peptides in blood was predicted [31].

Statistical analysis

The data collected in the current investigations were reported as sample means \pm standard deviations based on at least triplicate experiments. Whether differences existed between various treatments were studied based on statistical significance ($p < 0.05$).

Results and discussion

Determination of degree of hydrolysis (%DH)

The degree of hydrolysis of hazelnut proteins treated with 3 different proteases was determined (Fig. 1). %DH for the reference sample (sodium caseinate) was previously measured to lie within the range of 42–62% depending on the experimental conditions [22]. Current findings were comparable to the previous literature. The %DH values for thermolysin hydrolysates of hazelnut protein isolates (50.4%) were significantly higher than the trypsin- or chymotrypsin-treated samples (26.4 and 21.8%, respectively).

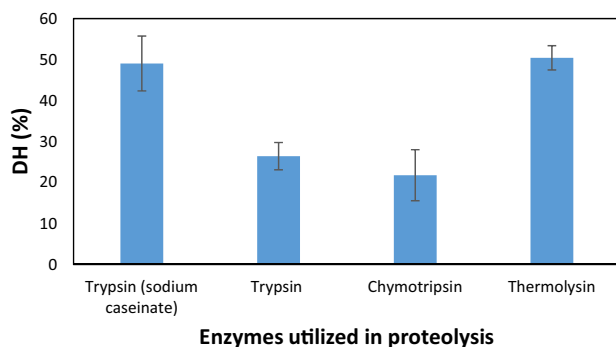


Fig. 1 Degree of hydrolysis (DH%) for hazelnut meal proteins hydrolyzed by various proteases as determined by the TNBS method

These findings can be explained by the relatively higher proteolytic activity of thermolysin towards hazelnut proteins as also predicted by *in silico* methods [17]. Here, trypsin demonstrated lower proteolytic activity towards hazelnut proteins compared to sodium caseinate. The extent of proteolysis is highly dependent on structural attributes of proteins [32], including the intramolecular distribution of amino acids and relative abundance of secondary structural motifs. In the previous literature, ACE inhibitory activity of hydrolysates were related to hydrolysis duration, demonstrating a direct relationship between ACE inhibitory activity and %DH [18, 19, 33]. Furthermore, ACE inhibitory peptides tend to be relatively shorter compared to other categories of bioactive peptides, such as antimicrobial peptides [34]. Based on Lowry analysis, the approximate protein concentration in the samples was determined to range between 1.20 and 5.80 mg/100 g. However, it must be noted that peptide composition determines ACE inhibitory activity rather than the peptide size. Furthermore, the current literature on, for example, partially fermented milk products, where %DH was relatively low (i.e., 9 to 18%) demonstrated significant ACE inhibition [35].

Fractionation of hydrolysates based on anion exchange chromatography

Hazelnut protein hydrolysates were fractionated using an anion exchange method, prior to which a variety of ion exchange (HiTrap DEAE FF, Capto-Q, Capto DEAE, Capto-S) and hydrophobic interaction (HiTrap Phenyl FF, HiTrap Butyl-S FF, HiTrap Octyl FF) columns were tested in pre-trials (data not shown). Since the binding rate was found to be high, the elution was straightforward and the obtained fractions did not require any pretreatments in the activity tests, Capto-Q was used in the following steps. It is noteworthy that in a variety of recent studies on food bioactive peptides, ACE inhibitory peptides were found to bear charged residues along with hydrophobic residues (for example, [16, 36]). Consequently, ion exchange chromatography was a valid approach to fractionate the hazelnut protein hydrolysates.

First, to test the influence of column volume on fractionation, 2 different sizes of the same column (1 and 5 ml) were examined (Figure S1 of Supplementary Data). As seen in Figure S1, significantly different elution profiles and potentially different hydrolysate compositions were acquired based on the proteolytic enzyme used and analytical column volume. Each and every 2 column volumes (CV) were collected as a separate fraction. Peptides that did not bind to the column were labelled as the “out” fraction. Consequently, 17 different fractions with varying compositions were prepared for each enzymatic treatment (Figure S1).

Measurement of ACE inhibitory activity

Hydrolysate fractions were evaluated in ACE inhibitory activity tests as exemplified on Figure S2. % ACE inhibitory activity values of the fractions that generated significant ACE inhibition ($>0\%$, $p < 0.05$) were presented in Fig. 2 as a function of both column bed volume and protease utilized. Due to the faster fractionation in the 5 ml column, it was possible to obtain fractions that exhibited ACE inhibition in earlier elution volumes. Consequently, total number of ACE inhibitory fractions in 5 ml column was less than the 1 ml counterpart, while higher inhibitory activities were observed (Fig. 2). In both cases, the number of ACE inhibitory thermolysin fractions was higher than (6 and 4 fractions, respectively, for Fig. 2a and b) that in trypsin or chymotrypsin fractions. The fraction with the highest inhibitory activity was also a thermolysin fraction (E1 (out), 95% inhibition) (Fig. 2b). The majority of the ACE inhibitory fractions contained weakly anionic or cationic peptides, the relatively earlier fractions and “out” fractions, respectively. Similar results were obtained by Liu et al. [16], where catalase was utilized in the hydrolysis of Asian hazelnut proteins. On average, IC_{50} values for the current fractions ranged between 0.13 and 4.83 mg protein ml^{-1}

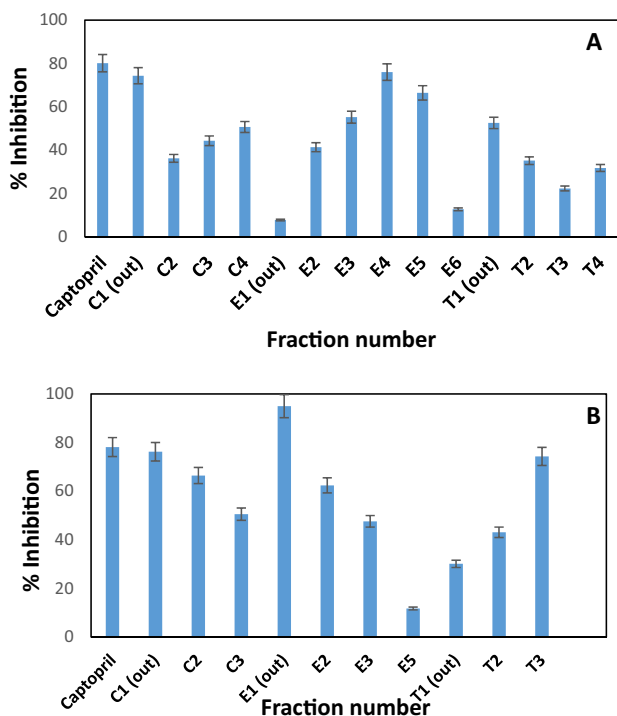


Fig. 2 ACE inhibitory activity (%) of peptide fractions hydrolyzed by various proteases and fractionated by a Capto Q (a) 1 ml, or (b) 5 ml column connected to an FPLC instrument. C, E, T Chymotrypsin, thermolysin and trypsin hydrolysate fractions, respectively. Out Unbound fractions

(Table 1), which were mostly comparable to earlier findings of Eroglu and Aksay [15] (0.22–0.29 mg protein ml^{-1} in the hydrolysates vs. 1.29 mg protein ml^{-1} in the protein isolates). Similarly, the IC_{50} data for Liu et al. [16] corresponded approximately to 0.01–0.13 mg ml^{-1} . While, captopril is a highly potent synthetic ACE inhibitor with a low IC_{50} value (0004 mg ml^{-1}), various proteolytic hydrolysates of sea cucumber indicated an IC_{50} value range of approx. 1.7–2.54 mg ml^{-1} [37]. A variety of inhibitor peptides with lower and higher IC_{50} values were also reviewed in the literature [38].

LC-Q-TOF/MS analysis of the hydrolysates

Fractions demonstrating ACE inhibitory activity were collected and analyzed via appropriate LC-Q-TOF/MS analysis techniques. First, in the literature (for example, UniProt database), there are more than 400 proteins that are related to *Corylus avellana* L. and after enzymatic proteolysis, possibly thousands of different peptides formed with various sizes and activity potentials. Here, we made an attempt to clarify the structures of all ionizable peptides. As detailed in the Supplementary Data section, each fraction was characterized with various peptides at different concentrations and since the concentration of each peptide is unknown, it was not possible to calculate an effective molecular weight for the fractions. However, an average molecular weight was calculated for all treatments and listed on Tables S1–S3.

A total of 179 different peptide spectra found in ACE inhibitory fractions and only a single spectrum is shown here as an example (Figure S3). The sequences of all determined peptides are listed in Supplementary Data section (Tables S1–S3) for all the 3 enzyme treatments along with their calculated physicochemical characteristics and bioactive potential based on their PeptideRanker values. The majority of the identified peptides originated from the “out” fractions (147 peptides), whereas 32 belonged to the weakly anionic fractions.

Table 1 IC_{50} (mg/ml) values for the FPLC fractions based on the 5 ml Capto Q column

Fraction	IC_{50} (mg ml^{-1})
C1 (out)	0.19
C2	0.24
C3	0.37
E1 (out)	0.13
E2	0.26
E3	0.41
E5	2.94
T1 (out)	0.82
T2	0.48
T3	0.20

In silico analysis of the identified sequences

As detailed on Tables S1–S3, none of the identified hazelnut peptides were found to be toxic agents in silico [25]. As anticipated, “out” fractions were mostly found to demonstrate higher pI values compared to the later fractions. However, the majority of the peptides (53.6%) had a pI value of ≤ 7 , while approx. 61% was characterized by a predicted pI value < 8 . A number of high pI peptides were also observed in the column-bound fractions. These findings are of practical interest, since cationic peptides could demonstrate various bioactivities including anti-microbial activity [34]. Since the majority of the current peptides were not listed in peptide databases, some of the current findings pointed out to the identification of novel proteins and/or peptides. All peptides listed on Tables S1–S3 were different than ACE inhibitory peptides (namely AVKVL, YLVR and TLVGR) purified by Liu et al. [16] from Asian hazelnuts (*Corylus heterophylla* Fisch.).

Based on PeptideRanker evaluation (Tables S1–S3), active fractions were demonstrated to contain both active (i.e., ACE inhibitory) and inactive peptides. In thermolysin-treated fractions, 22 different peptides demonstrated a PeptideRanker score of > 0.5 . Similarly, 3 chymotryptic and 4 tryptic peptides were expected to be bioactive according to their PeptideRanker values. In total, potentially bioactive peptides accounted for approx. 16.2% of the identified peptides (i.e., 29 out of 179). Similar to our earlier findings [17], non-gastrointestinal thermolysin was found to be more efficient in the generation of ACE inhibitory peptides from hazelnut proteins compared to trypsin and chymotrypsin, both in terms of the number of inhibitory peptides generated (Tables S1–S3), and the extent of in vitro ACE inhibition (%) (Fig. 2).

In the next set of investigations, in silico verified ACE inhibitory peptides were studied for their interactions with human ACE based on Pepsite2 methodology [28]. The mechanism of interaction between ACE and the peptide with highest PeptideRanker score for each proteolytic treatment was examined and a sample figure was presented (Figure S4). Namely SPLAGR, VPHW and PGHF peptides were

analyzed. PeptideRanker is a respectable tool that has been utilized as a prediction tool in a number of studies on the evaluation of bioactive food peptides (for example, [36, 39]). Table 2 summarizes the amino acids in these 3 peptides that could potentially interact with ACE. In all cases, the binding models were shown to be statistically significant and their potential ACE inhibitory activity was also verified by BIOPEP “Calculations” tool [27] (data not shown).

Based on the most probable model, SPLAGR tryptic peptide was predicted to yield 16 potential binding points (i.e., amino acids) on the ACE molecule (Table 2) and hence, potentially induce inhibition. Since human ACE consists of 1306 amino acids, the interaction between a certain peptide and ACE molecule being limited to only specific 16 amino acids may be classified as a relatively “specific” interaction. For comparative purposes, ACE inhibitory VPP peptide [40] was investigated as a reference and predicted to bind 14 different amino acids on ACE molecule. IPP and VPP are possibly the most intensely investigated bioactive food peptides. They are lactotriptides generated from milk casein. They have been studied in many clinical studies in addition to in vitro experiments [41–43]. Furthermore, some commercial products (i.e., food supplements) that include these peptides in their formulations are currently available. These peptides could also form in situ in partially fermented dairy products. Consequently, they are valuable food components that can be regarded as a reference point for novel food peptides. In that sense, we have utilized VPP as a reference molecule for in silico predictions. Among the potentially VPP bound amino acids, 11 of them were predicted to be common with hazelnut peptides listed on Table 2, while 3 of them (bold on Table 2) were specific to VPP. Similarly, chymotryptic VPHW and thermolysin generated PGHF could interact with 10 and 11 amino acids, respectively, of ACE, potentially leading to inhibition (Table 2).

For the peptides listed on Table 2 and their potential binding sites on ACE, a brief in silico analysis was carried out to determine pI values and molecular charges (Table 3). In these calculations, ACE amino acids were treated as an intact peptide. The findings demonstrated that VPP and its corresponding binding sites had similar pI and differences

Table 2 List of the active amino acids on current sequences that potentially interact with ACE and comparison of the potential binding sites

Sequence	Active amino acids	p value	Potentially bound amino acids on the ACE molecule
SPLAGR	Pro-2 Leu-3 Ala-4 Gly-5 Arg-6	0.0001473	Trp279, Gln281, His353, Ala354, His383, Glu384, Glu 411, Asp415, Phe457, Phe460, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523, Ser526, Phe527
VPHW	Val-1 Pro-2 His-3 Trp-4	3.959E-05	Gln281, His353, Ala354, His383, Glu411, Asp415, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523
PGHF	Pro-1 Gly-2 His-3 Phe-4	2.263E-05	Gln281, His353, His383, Glu384, His387, Glu411, Phe457, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523
VPP	Val-1 Pro-2 Pro-3	2.951E-06	Gln281, His353, His383, His387, His410 , Glu411, Ala412 , Asp415, Phe457, His513, Tyr520, Tyr523, Ser526, Phe527

VPP peptide was included as a positive control

Table 3 pI values and corresponding charge pairs for the bioactive peptides that potentially interact with ACE and their potential binding sites on the ACE molecule

Sequence	pI value	Corresponding charge	pI value for potentially bound ACE amino acids	Corresponding charge
SPLAGR	10.11	1	5.76	- 0.5
VPHW	7.1	0.5	6.29	0.5
PGHF	7.1	0.5	5.76	- 0.5
VPP	5.88	-	6.17	0.5

ACE inhibitory VPP peptide was included here as a positive control

Table 4 Molecular docking scores for the most probable ACE-inhibitor for each and every protease treatment along with the VPP peptide vs human ACE

Rank	Docking score			
	VPP	VPHW	PGHF	SPLAGR
1	- 96.288	- 202.233	- 192.080	- 179.023
2	- 95.176	- 197.225	- 192.059	- 178.591
3	- 92.827	- 197.045	- 190.518	- 177.795
4	- 91.325	- 196.942	- 190.407	- 177.455
5	- 91.268	- 196.027	- 190.313	- 174.295
6	- 90.473	- 194.653	- 188.750	- 174.087
7	- 90.455	- 193.983	- 187.640	- 172.810
8	- 89.591	- 193.341	- 187.408	- 172.625
9	- 89.312	- 192.846	- 187.271	- 172.512
10	- 89.203	- 192.718	- 185.796	- 171.870

in molecular charges were small, consequently, the electrostatic interactions were relatively less influential. In the current case, the differences between pI and charge values for the 3 peptides and their potential binding sites on ACE were more pronounced, especially for the tryptic SPLAGR peptide (Table 3). Consequently, in the current samples,

electrostatic interactions may have a stronger influence on the ACE inhibitory activity.

Molecular docking

Using a molecular docking approach, peptide-protein interactions were also studied via HPEPDOCK, which generated docking scores and 3D protein-peptide interaction images [30]. The docking scores for the interactions between the current potentially bioactive peptides and human ACE were summarized on Table 4. In HPEPDOCK, the first model energy scores are the best out of the energy scores obtained from 100 different models related to Protein-Peptide interactions. VPP peptide achieved an energy score of - 96.288 in HPEPDOCK, while VPHW, PGHF and SPLAGR peptides were assigned energy scores of - 202.333, - 192.080 and - 179.023, respectively. Based on these docking scores, the current peptides were predicted to demonstrate a stronger interaction with ACE compared to the VPP peptide. In addition, Figure S5 demonstrated the regions of interaction for all cases, which were visibly different in all cases.

ADMET analysis and half-life of the peptides

ADMET properties of the most probable ACE inhibitory peptides listed on Table 2 were studied in silico [29]. In terms of absorption characteristics (Table 5), tryptic SPLAGR, chymotryptic VPHW, and thermolysin generated PGHF peptides could not penetrate the blood-brain barrier (BBB) or demonstrate Caco-2 permeability. However, VPHW and PGHF could be absorbed in the human intestinal absorption (HIA) system.

The major peptide transporters expressed in Caco-2 include HPT1 and PepT1 and it was shown that with alteration to the cell model or origin, the level of expression could be tailored [44]. Following oral administration, the major peptide transporters in the human body include PepT1,

Table 5 Critical ADMET parameters for the most probable ACE-inhibitor for each and every protease treatment

		SPLAGR	VPHW	PGHF
Absorption	Blood-Brain barrier	-	-	-
	Human intestinal absorption	-	+	+
	Caco-2 permeability	-	-	-
Metabolism	CYP450 2C9 substrate	Non-substrate	Non-substrate	Non-substrate
	CYP450 2D6 substrate	Non-substrate	Non-substrate	Non-substrate
	CYP450 3A4 substrate	Non-substrate	Substrate	Non-substrate
	CYP450 1A2 inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor
	CYP450 2C9 inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor
	CYP450 2D6 inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor
	CYP450 2C19 inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor
	CYP450 3A4 inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor
Toxicity	Carcinogens	Non-carcinogens	Non-carcinogens	Non-carcinogens

PepT2, PhT1, and PhT2 [45]. While Pept1 is a low-affinity, high-capacity transporter that is predominantly expressed in the intestine, Pept2 is a high-affinity, but low-capacity transporter that has a broader tissue distribution predominantly in the kidneys. Pept1 was described as the carrier responsible for the uptake of di- and tripeptides in the small intestine. Previously some ACE inhibitors were shown to be transported via Pept1, whereas the specificities of certain peptides could affect their transportation characteristics with Pept1 or Pept2 [45]. In addition, since the 2 of 3 peptides studied here include a histidine residue (H), PhT1 or PhT2 might also be relevant for their uptake.

In terms of metabolic characteristics (Table 5), these three peptides were mostly not substrates or inhibitors for Cytochrome P450 (CYP450) enzymes. The only exception was that chymotryptic VPHW could potentially serve as a substrate for CYP450 3A4 enzyme. Cytochrome P450 (CYP 450) is a hemeprotein that plays a key role in the metabolism of drugs and other xenobiotics [46]. As indicated in the previous literature, there might always be a certain likelihood that small peptides or peptide drugs might result in CYP inhibition which in turn could lead to drug–drug interactions and side effects [47]. Based on these information, current findings could imply a slight potential to generate interactions with other xenobiotics.

Finally, none of the peptides were classified as carcinogens by the admetSAR system [29]. Based on these findings, the hydrolysates generated from hazelnut protein isolates are well-tolerable, potentially non-toxic, non-carcinogenic components which do not or minimally affect the usual metabolism or the pharmacokinetics of medicinal components. Meanwhile, intestinal uptake seems to be possible in the human body.

In addition to ADMET characteristics, potential lifespan of the bioactive peptides is also critical in the circulatory system. Hence, the half-life of these three peptides in blood was predicted *in silico* via PLIFEPRED [31]. Based on the predictions, the half-lives of the current peptides and the reference were found to be approx. 834, 981, 834 and 837 s for PGHF, SPLAGR, VPHW and VPP, respectively. Essentially, the half-life of all 4 peptides was reasonably comparable and they can all be classified as relatively short-lived peptides.

Discussion

To summarize the findings, in the current work, a variety of hazelnut protein hydrolysate fractions bearing weakly anionic and cationic sequences were generated and analyzed for ACE inhibitory potential. SPLAGR peptide listed on Table 2 consisted of 50% hydrophobic, 16.67% basic and 33.33% neutral (i.e., 2 in 6) residues. For VPHW, the sequence was characterized by 75% hydrophobic and 25% basic (i.e., 1 in 4) residues. For PGHF, 50% of the residues in the sequence

were hydrophobic, and 25% each were basic and neutral residues, respectively. Consequently, while all three were considerably hydrophobic, there was some positive charge in all cases, which suggested electrostatics could potentially influence ACE inhibitory activity.

Hydrophobic characteristics and/or positive charge of C-terminal amino acid is highly influential on the activities of small ACE inhibitory peptides (i.e., ≤ 6 amino acids), whereas possibly due to the steric effects, C-terminal is less influential for larger peptides [48]. Previously, positively charged C-terminal lysine or arginine residues in casein based peptides were shown to contribute to ACE inhibition [49]. The three small peptides studied here were characterized by C-terminal arginine, tryptophan and phenylalanine residues. Two of these residues are potentially non-charged and non-polar residues, while one has polar and basic characteristics (arginine). The data acquired by Liu et al. [16] on Asian hazelnuts also demonstrated that ACE inhibitory peptides mostly consisted of hydrophobic and basic residues. Here, while anion exchange was utilized, the presence of apolar and/or basic residue bearing peptides primarily enhanced the ACE inhibition potential.

The findings pointed out to the low toxicity, non-carcinogenicity and short circulation attributes of hazelnut peptides along with their potentially strong binding with human ACE. The effectiveness (IC₅₀) of these peptides was comparable to various foods resources, while relatively short circulation durations remain to be a major problem for many unmodified food peptides including the current hydrolysates.

Conclusion

Based on simple aqueous extraction techniques, hazelnut protein isolates can be generated in a fashion that can be scaled up to industrial settings. Current investigations predicted that hazelnut protein hydrolysates were well-tolerable, potentially non-toxic, and non-carcinogenic. The peptides identified here were not identical to the peptides generated from Asian hazelnuts [16, 50].

Although purification of bioactive peptides generates high-activity products, here, we have effectively demonstrated that multiple fractions in the enzymatic hydrolysates possessed ACE inhibitory characteristics. In terms of manufacture costs in commercial applications, such as functional foods and food supplements, we think that less purified fractions or in some cases, a total hydrolysate is more likely to be exploited. While further work on synthesis of the currently identified peptides and their re-evaluation is inarguably necessary, MS-based identification of hazelnut peptides could lead the path to the design of functional agents that can be utilized in functional foods, food supplements and pharmaceutical formulations. Unless stabilized through

encapsulation, molecular complexation, conjugation or other means of stabilization including molecular modification, many food bioactive peptides could bear various digestive and/or circulatory stresses in the human body, which in turn could reduce their effectiveness. This problem remains to be an under-investigated issue in the food bioactive peptides including that of hazelnuts.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03700-6>.

Acknowledgements Hazelnut cakes were donated by Neva Foods. The authors would like to thank Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal and Ms. Emel Akgün for their technical support at Labmed.

Funding This study was funded by a grant from TÜBİTAK 1001 Program, Turkey (Grant No. 2170063).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Compliance with ethics requirements This article does not contain any studies with human or animal subjects.

References

- Erdmann K, Cheung BW, Schröder H (2008) The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J Nutr Biochem* 19(10):643–654
- Kirkland EB, Heincelman M, Bishu KG, Schumann SO, Schreiner A, Axon RN et al (2018) Trends in healthcare expenditures among US adults with hypertension: national estimates, 2003–2014. *J Am Heart Assoc* 7(11):e008731
- Li-Chan EC (2015) Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Curr Opin Food Sci* 1:28–37
- Hong F, Ming L, Yi S, Zhanxia L, Yongquan W, Chi L (2008) The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs? *Peptides* 29(6):1062–1071
- Aungst B, Saitoh H, Burcham D, Huand S, Mousa S, Hussain M (1996) Enhancement of the intestinal absorption of peptides and nonpeptides. *J Control Release* 41(1):19–31
- Bruno BJ, Miller GD, Lim CS (2013) Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Ther Deliv* 4(11):1443–1467
- Hartmann R, Meisel H (2007) Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotech* 18(2):163–169
- Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W (2004) Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr* 92(3):357–366
- Ozdemir F, Akinci I (2004) Physical and nutritional properties of four major commercial Turkish hazelnut varieties. *J Food Eng* 63(3):341–347
- Ortolani C, Ballmer-Weber BK, Hansen KS, Spano M, Wüthrich B, Bindslev-Jensen C et al (2000) Hazelnut allergy: a double-blind, placebo-controlled food challenge multicenter study. *J Allergy Clin Immunol* 105(3):577–581
- Vieths S, Reindl J, Müller U, Hoffmann A, Hausteiner D (1999) Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple *in vitro* procedure. *Eur Food Res Technol* 209(6):379–388
- Flinterman AE, Akkerdaas JH, Knulst AC, Van Ree R, Pasmans SG (2008) Hazelnut allergy: from pollen-associated mild allergy to severe anaphylactic reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8(3):261–265
- Tatar F, Tunç MT, Kahyaoglu T (2015) Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.) protein concentrates: functional and rheological properties. *J Food Sci Tech* 52(2):1024–1031
- Aydemir LY, Gökbulut AA, Baran Y, Yemenicioğlu A (2014) Bioactive, functional and edible film-forming properties of isolated hazelnut (*Corylus avellana* L.) meal proteins. *Food Hydrocoll* 36:130–142
- Eroglu EC, Aksay S (2017) Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) inhibitory effects of hazelnut protein hydrolysate prepared using pepsin. *Indian J Pharm Educ Res* 51(3):S417–S420
- Liu C, Fang L, Min W, Liu J, Li H (2018) Exploration of the molecular interactions between angiotensin-I-converting enzyme (ACE) and the inhibitory peptides derived from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.). *Food Chem* 245:471–480
- Gülseren İ (2018) *In silico* methods to identify ACE and DPP-IV inhibitory activities of ribosomal hazelnut proteins. *J Food Meas Charact* 12(4):2607–2614
- Gülseren İ, Çakır B, Çağlar AF (2019) Preliminary investigations on *in vitro* ACE-inhibitory activities of tryptic peptides produced from cold press deoiled hazelnut meals. *GIDA/J Food* 44(2):309–317
- 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 hydrolysates. *J Food Meas Charact* 13(3):2328–2338
- Gülseren İ, Corredig M (2013) Storage stability and physical characteristics of tea-polyphenol-bearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. *J Agric Food Chem* 61(13):3242–3251
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83(2):346–356
- Adler-Nissen J (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem* 27(6):1256–1262
- Nielsen PM, Petersen D, Dambmann C (2001) Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci* 66(5):642–646
- Sheih IC, Fang TJ, Wu TK (2009) Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chem* 115(1):279–284
- Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, Raghava GP, Open Source Drug Discovery Consortium (2013) *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLoS ONE* 8(9):e73957
- Mooney C, Haslam NJ, Pollastri G, Shields DC (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
- Minkiewicz P, Dziuba J, Iwaniak A, Dziuba M, Darewicz M (2008) BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *J AOAC Int* 91:965–980
- Trabuco LG, Lise S, Petsalaki E, Russell RB (2012) PepSite: prediction of peptide-binding sites from protein surfaces. *Nucleic Acids Res* 40(W1):W423–W427
- Cheng F, Li W, Zhou Y, Shen J, Wu Z, Liu G, Lee PW, Tang Y (2012) admetSAR: a comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. *J Chem Inf Model* 52(11):3099–3105

30. Zhou P, Jin B, Li H, Huang SY (2018) HPEPDOCK: a web server for blind peptide–protein docking based on a hierarchical algorithm. *Nucleic Acids Res* 46(W1):W443–W450
31. Mathur D, Singh S, Mehta A, Agrawal P, Raghava GP (2018) *In silico* approaches for predicting the half-life of natural and modified peptides in blood. *PLoS ONE* 13(6):e0196829
32. Zhou C, Hu J, Yu X, Yagoub AEA, Zhang Y, Ma H et al (2017) Heat and/or ultrasound pretreatments motivated enzymolysis of corn gluten meal: hydrolysis kinetics and protein structure. *LWT Food Sci Technol* 77:488–496
33. Amado IR, Vázquez JA, González P, Esteban-Fernández D, Carrera M, Piñeiro C (2014) Identification of the major ACE-inhibitory peptides produced by enzymatic hydrolysis of a protein concentrate from cuttlefish wastewater. *Mar Drugs* 12(3):1390–1405
34. Taniguchi M, Aida R, Saito K, Kikura T, Ochiai A, Saitoh E, Tanaka T (2020) Identification and characterization of multifunctional cationic peptides from enzymatic hydrolysates of soybean proteins. *J Biosci Bioeng* 129(1):59–66
35. Tavares TG, Contreras MM, Amorim M, Martín-Álvarez PJ, Pintado ME et al (2011) Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. *Int Dairy J* 21(12):926–933
36. Bleakley S, Hayes M, O’Shea N, Gallagher E, Lafarga T (2017) Predicted release and analysis of novel ACE-I, renin, and DPP-IV inhibitory peptides from common oat (*Avena sativa*) protein hydrolysates using *in silico* analysis. *Foods* 6(12):108
37. Ghanbari R, Zarei M, Ebrahimpour A, Abdul-Hamid A, Ismail A, Saari N (2015) Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory and anti-oxidant activities of sea cucumber (*Actinopyga lecanora*) hydrolysates. *Int J Mol Sci* 16(12):28870–28885
38. Manoharan S, Shuib AS, Abdullah N (2017) Structural characteristics and antihypertensive effects of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides in the renin-angiotensin and kallikrein kinin systems. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 14(2):383–406
39. Mudgil P, Kamal H, Yuen GC, Maqsood S (2018) Characterization and identification of novel antidiabetic and anti-obesity peptides from camel milk protein hydrolysates. *Food Chem* 259:46–54
40. Yamamoto N, Akino A, Takano T (1994) Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* 77(4):917–922
41. Boelsma E, Kloek J (2009) Lactotripeptides and antihypertensive effects: a critical review. *Brit J Nutr* 101(6):776–786
42. Aihara K, Kajimoto O, Hirata H, Takahashi R, Nakamura Y (2005) Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *J Am Coll Nutr* 24(4):257–265
43. Jauhainen T, Vapaatalo H, Poussa T, Kyrönpalo S, Rasmussen M, Korpela R (2005) *Lactobacillus helveticus* fermented milk lowers blood pressure in hypertensive subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement. *Am J Hypertens* 18(12 Pt 1):1600–1605
44. Behrens I, Kamm W, Dantzig AH, Kissel T (2004) Variation of peptide transporter (PepT1 and HPT1) expression in Caco-2 cells as a function of cell origin. *J Pharm Sci* 93(7):1743–1754
45. Ashraf T, Kao A, Bendayan R (2014) Functional expression of drug transporters in glial cells: potential role on drug delivery to the CNS. *Adv Pharmacol* 71:45–111
46. Estabrook RW (2003) A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab Dispos* 31:1461–1473
47. Lau JL, Dunn MK (2018) Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem* 26(10):2700–2707
48. Pripp AH, Isaksson T, Stepaniak L, Sørhaug T (2004) Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *Eur Food Res Technol* 219(6):579–583
49. Meisel H (2004) Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *BioFactors* 21(1–4):55–61
50. Liu C, Yu Y, Liu F, You L (2019) Purification and molecular docking study of Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from alcalase hydrolysate of hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch) protein. *Food Nutr Sci* 10(11):1374–1387

Publisher’s Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

EK-2

PRELIMINARY INVESTIGATIONS *IN VITRO* ACE-INHIBITORY ACTIVITIES OF TRYPTIC PEPTIDES PRODUCED FROM COLD PRESS DEOILED HAZELNUT MEALS

İbrahim Gülseren^{1*}, Bilal Çakır^{2,3}, Ahmet Furkan Çağlar¹

¹Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Natural Sciences, İstanbul Sabahattin Zaim University (İZÜ), Küçükçekmece, İstanbul, Turkey

²İstanbul Sabahattin Zaim University (İZÜ), Halal Food R&D Center, Küçükçekmece, İstanbul, Turkey.

³Marmara University, Institute of Health Sciences, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Maltepe, İstanbul, Turkey.

Received/Geliş: 19.12.2018; Accepted/Kabul: 17.03.2019; Published online/Online baskı: 22.03.2019

Gülseren, İ. Çakır, B., Çağlar, A.F. (2019). Preliminary investigations *in vitro* ace-inhibitory activities of tryptic peptides produced from cold press deoiled hazelnut meals. *GIDA* (2019) 44 (2): 309-317 doi: 10.15237/gida.GD18125

Gülseren, İ. Çakır, B., Çağlar, A.F. (2019). Soğuk pres fındık posalarından üretilmiş triptik peptitlerin *in vitro* ace inhibe edici aktiviteleri üzerine ön incelemeler. *GIDA* (2019) 44 (2): 309-317 doi:10.15237/gida.GD18125

ABSTRACT

Hazelnut (*Corylus avellana* L.) is a rich source of proteins which are concentrated in deoiled meals during hazelnut oil manufacture. Here, an *in vitro* attempt was made to evaluate the biological functionality of tryptic hazelnut peptides. In our *in silico* investigations, a specific subset of hazelnut proteins was predicted to demonstrate ACE-inhibitory and DPP-IV-inhibitory activities. Consequently, hazelnut protein concentrates were produced from cold press deoiled meals and subjected to tryptic hydrolysis (37°C). The progress of trypsinolysis was monitored using size exclusion chromatography (SEC), fast protein liquid chromatography (FPLC) and Raman spectroscopy. While the protein hydrolyzates had limited ACE-inhibitory activity, after 240 min of trypsinolysis, ACE-inhibitory activity was approximately 40% at a relatively low protein concentration level. Although further clarifications are necessary, current findings demonstrated hazelnut meal could be considered as a valuable source of ACE-inhibitory peptides that can be utilized in the formulation of functional foods and food supplements.

Keywords: Cold press meals; plant protein peptides; common hazelnut (*Corylus avellana* L.); trypsinolysis; ACE-inhibition.

SOĞUK PRES FINDIK POSALARINDAN ÜRETİLMİŞ TRİPTİK PEPTİTLERİN *IN VITRO* ACE İNHİBE EDİCİ AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ÖN İNCELEMELER

ÖZ

Fındık (*Corylus avellana* L.) proteince zengin bir kaynaktır ve soğuk pres fındık yağı üretimi sürecinde oluşan fındık posaları proteince de zenginleşmektedir. Bu çalışmada, triptik fındık peptitlerinin biyolojik fonksiyonlarını değerlendirmek için *in vitro* analizlerde bulunulmuştur. Grubumuzun önceki çalışmalarında, *in silico* yöntemlerle fındık peptitlerinin biyoaktivitelerini incelemek için fındık proteinlerinin spesifik bir alt kümesi incelenmiş ve ACE- ve DPP-IV-önleyici aktivitelerin varlığı öngörülmüştür. Bu bulgulara bağlı olarak, soğuk pres yönteminde ortaya çıkan fındık posalarından, fındık proteini konsantreleri üretilmiş ve bu konsantreler triptik hidrolize (37°C) tabi tutulmuştur. Tripsinliz prosesi, boyutsal ayırım kromatografisi (SEC), hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) ve Raman spektroskopisi kullanılarak takip edilmiştir. Enzimatik muamele görmemiş protein konsantrelerinin sınırlı ACE inhibe edici aktivitesi varken, 240 dakikalık tripsinlizde oluşan peptitlerin ACE-inhibitör aktivitesi, düşük protein konsantrasyonlarında dahi yaklaşık %40 düzeyinde gerçekleşmiştir. Mevcut bulgular, fındık posasının ACE-inhibitör peptitler açısından önemli bir kaynak olarak değerlendirilebileceğini ve fındık posasından hidrolizatlarının fonksiyonel gıdaların ve gıda takviyelerinin formülasyonunda kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Soğuk pres posaları; bitki proteini peptitleri; fındık (*Corylus avellana* L.); tripsinliz; ACE-inhibisyonu.

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ ibrahim.gulseren@izu.edu.tr,

☎ (+90) 212 692 9619,

(+90) 212 693 9758

INTRODUCTION

Due to the ever increasing global demand for proteins, affordable and high quality protein products are highly sought after. Consequently plant proteins represent a sustainable source of proteins for human diets. Since the conversion efficiency of plant proteins to animal proteins is fairly poor (approximately 15%) (Day, 2013), it makes perfect sense to search for alternative ways to utilize plant proteins in foods and other consumer products. Consequently, one of the research priorities in our group is the valorization of cold press and other oil processing by-products (i.e., deoiled meals of oil fruits and oil seeds) with the aim of generating a variety of economic plant protein products and their corresponding hydrolyzates. Since protein content in oilseeds and oil fruits is relatively high and proteins are further concentrated upon deoiling, they represent a reasonably economic and sustainable resource for protein manufacture.

Hazelnuts (*Corylus avellana* L.) are among the major agricultural products of Turkey, where approximately 80% of the global production is carried out (roughly 550,000 tonnes per year) (Ozdemir and Akinci, 2004), while the other major producers include other Mediterranean countries and western USA. Hazelnuts are rich in oil content (approx. 60%) and known to demonstrate various bioactivities including their cardioprotective effects. This effect is possibly due to the mono- and polyunsaturated fatty acids in the hazelnuts (Parcerisa et al., 1997). Other bioactive compounds of the hazelnuts include polyphenols, tocopherols and squalene (Alasalvar et al., 2006, 2009; Dogan et al. 2007). According to Miraliakbari and Shahidi (2008), phytosterols and phytostanols contribute to the cholesterol lowering and antioxidant properties of hazelnuts.

Industrial production of cold press hazelnut oil is also increasing which means the deoiled meal represents an increasing potential of valorization. According to the data provided by Alphan et al. (1996), it is possible to anticipate up to 45% proteins in the meal. Although there is some data on the technical functionality of hazelnut proteins (Tatar et al., 2015), the data on possible bioactive

characteristics of hazelnut proteins (Aydemir et al., 2014) and their hydrolyzates are truly scarce. Most of the literature related to the hazelnut proteins so far focused heavily on the reduction of food allergies (Ortolani et al., 2000; Vieths et al., 1999; Flinterman et al., 2008). It is noteworthy that the relative digestive stability of hazelnut allergens were found to be lower compared to peanut allergens (Vieths et al., 1999).

Bioactive peptides may form during the processing or digestion of protein-containing foods (Vermeirssen et al., 2004). Furthermore, using proteases, bioactive peptides can be produced by breaking down food proteins *in vitro*. Enzymatic preparation of bioactive peptides are highly advantageous since the use of toxic chemicals and organic solvents can be avoided and the final products are suitable for use in food, cosmetics and pharmaceutical products (Agyei and Danquah, 2011), while the demonstration of a variety of bioactivities including anti-oxidative, anti-carcinogenic, antimicrobial activities as well as ACE-inhibition activities can also be possible.

In our previous studies, an attempt to predict the potential bioactivities of peptides generated from hazelnut proteins was made *in silico* and a specific subset of hazelnut proteins was predicted to primarily demonstrate ACE-inhibitory and DPP-IV-inhibitory activities, while anti-oxidative activity was a much less likely third category (Gülseren, 2018).

Angiotension I-converting enzyme (ACE) converts angiotensin I to angiotensin II, which is a vasoconstrictor. Also, ACE hydrolyzes bradykinin, which is a vasodilator peptide. Consequently, ACE action elevates blood pressure in humans (Vermeirssen et al., 2004; Hartmann and Meisel, 2007). ACE-inhibitory peptides have the capabilities of reducing blood pressure and the likelihood of hypertension (Vermeirssen et al., 2004). Although bioactive peptides are usually not as efficient as synthetic drug molecules, due to the absence of pronounced side effects, they can conveniently be utilized in functional foods or food supplements (Li et al., 2005). Furthermore, it is thought that the

rate of bioactive peptide removal from the body is lower than that of synthetic drugs and the affinity to tissues is higher (Erdmann et al., 2008).

In this study, a further attempt was carried out in order to investigate the ACE-inhibition characteristics of tryptic hazelnut peptides *in vitro*. Due to the promising results presented here, a comprehensive study on the influence of various proteases on bioactivities and allergenic characteristics of hazelnut proteins is currently being executed.

MATERIALS and METHODS

Production of protein concentrates

Cold press deoiled hazelnut meal samples were generously donated by Oneva (Neva Foods Ltd., İstanbul, Turkey), a local manufacturer of cold press oils. In all cases, the maximum temperature observed by the cold press samples was lower than 40°C. All chemicals used were of reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated.

Protein extraction was based on the alkaline extraction-isoelectric precipitation (AE-IP) method. In this technique, firstly, solubilization of protein molecules at basic pH is carried out, which was followed by the isoelectric precipitation at acidic pH values (Boye et al. 2010). Briefly, 50 g of deoiled meal was dispersed in water (1:15, w/v) and the pH of the medium was adjusted to pH 9.5 using 1.0 N NaOH. The dispersions were kept stirred at 500 rpm at ambient temperature ($22\pm 1^\circ\text{C}$) for 2 h to facilitate hydration. Immediately afterwards, the dispersions were centrifuged at $10000\times g$ for 15 min at 4 °C using a CR22N high-speed refrigerated centrifuge (Hitachi Koki Co., Ltd., Tokyo, Japan). The supernatant containing the solubilized proteins was collected and the medium pH was adjusted to pH 4.5 in order to induce isoelectric precipitation. To ensure the completion of protein precipitation, the supernatant was once again centrifuged at identical conditions. The pellet was collected and immediately frozen at -20°C . Frozen samples were lyophilized using a Teknosem TRS 2/2V freeze drier (Teknosem Corp., İstanbul, Turkey).

In vitro trypsinolysis

Trypsinolysis was carried out based on the previous literature (Gülseren and Corredig, 2013). An aqueous dispersion of the protein concentrate was prepared in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7) at a protein concentration level of 1% by stirring for 1 h. Trypsin was obtained from Sigma Aldrich Corp. (T1426). Tryptic digestion was carried out for 2 h at an enzyme to protein ratio of 1:1000 (w/w) on a thermomixer (MIULAB Thermo Shaker Incubator, 37°C, 1000 rpm). Immediately afterwards, the digest was heated to 95°C and held at this temperature for 5 min. The samples were rapidly cooled using ice. Upon reaching the ambient temperature, the samples were centrifuged for 30 min at $5000\times g$ to remove insoluble aggregates. Prior to chromatographic analysis, all samples were filtered through 0.45 µm PTFE syringe filters (Isolab, Germany).

Size exclusion chromatography (SEC)

In order to monitor the progress of trypsinolysis, size exclusion chromatography was utilized on a Shimadzu LC-20AD HPLC system (Shimadzu Scientific Instruments) which consisted of a pump, thermostated column compartment and photodiode array detector. Immediately after trypsinolysis, the molecular size distribution of the partially hydrolyzed peptides were analyzed using a desalting column (HiTrap™ desalting column, Product No: 17-408-01, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The column equilibration and elution buffer was 50 mM phosphate buffer (pH 7) which contained 0.5 M NaCl. An isocratic flow was utilized (1 ml/min and 40°C). The detection wavelength was 214 nm. As a molecular size reference, a standardized BSA solution was used (Product No: P5619, Sigma-Aldrich Corp).

Fast protein liquid chromatography (FPLC)

Hazelnut proteins and their corresponding peptides were also analyzed using AKTA - Pure FPLC System (GE). In order to facilitate separation, 1 ml HiTrap DEAE FF anion exchange columns (GE) were utilized. Analysis was carried out for 40 column volumes (CV) using 50 mM Tris-HCl buffer as the eluent (pH 8.5), while a NaCl gradient (0-0.6 M) to ensure fractionation. UV detection was carried out at 280 nm.

Raman spectroscopy

Raman spectroscopy was carried out using a Rigaku Progeny X2 instrument. The spectral range was 200 – 2000 1/cm, while the spectral resolution was 7 – 10 1/cm. TE cooled CCD detection was used at a wavelength of 785 nm. BSA reference solution was utilized for comparative purposes.

Measurement of ACE inhibitory activity

All the solutions and reactants used in this assay were prepared in 100 mM sodium borate buffer (pH 8.3). ACE-inhibition assay was carried out based on the method described by Sheih et al. (2009) with slight modifications. 200 µl of 5 mM HHL substrate (N-Hippuryl-His-Leu hydrate) was mixed with peptide dispersions prepared by trypsinolysis. The mixture was incubated at 37°C for 10 min. Immediately afterwards, 20 µl of concentrated trypsin solution was added to generate an enzyme concentration of 1.68 mU in the mixture. The incubation was carried out for 0-4 h at 37°C and stopped by the addition of 250 µl HCl (1 M). The final mixture was injected into the HPLC device for the determination of hippuric acid (Sheih et al., 2009). Ascentis C18 Column (4.6 mm ID × 250 mm, Supelco) with a particle diameter of 5 µm was used in the analysis. The mobile phase was composed of 1:1 mixture of ethanol and water by volume containing 1 ml/L TFA. The absorbance was detected at 228 nm. The analysis was carried out at 40°C at a flow rate of 1 ml/min. In order to determine % ACE inhibition, the performance of the peptide samples was compared to the blank sample (i.e.,

water was added instead of peptide dispersion). 0.02% sodium azide was added to all samples and solutions as a bacteriostatic in all cases.

Statistical analysis

Data were presented as the means ± standard deviations from at least triplicate experiments in all cases. The differences between samples were also evaluated based on statistical significance ($P < 0.05$). Statistical significance was determined based on ANOVA tests.

RESULTS and DISCUSSION

Firstly, using a thermomixer, trypsinolysis of hazelnut protein concentrates was carried out at 37°C at an enzyme: substrate ratio of 1:1000. The progress in hydrolysis (0-4 h) was monitored based on size exclusion chromatography (Figure 1). As time passed, the peaks slightly shifted to the right-hand side of the spectrum indicating that there were smaller moieties in the samples due to enzymatic hydrolysis. Since the total number of moles in the system might have increased and some of the peptide bonds (i.e., 214 nm detection) became more detectable, in some cases the total peak area significantly increased as well. Variations in the molar extinction coefficients could also lead to this observation. As trypsinolysis took place, an increasing extent of smaller peptides were observed. Furthermore, UV absorbance values decreased with hydrolysis time as previously observed by De Gobba et al. (2014).

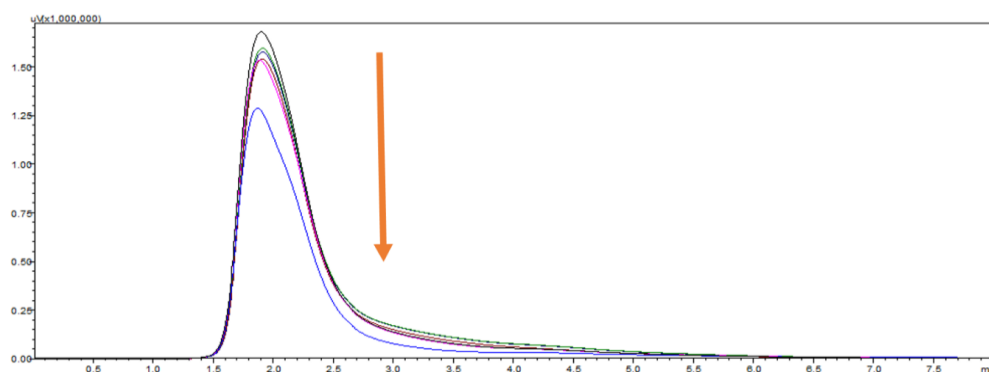


Figure 1. Size exclusion chromatography (SEC) analysis of trypsin treated hazelnut protein concentrates. Time of hydrolysis (0-240 min) increased in the direction of the arrow. Every curve represented a single time point in trypsinolysis (0, 15, 30, 60, 120 and 240 min).

To further illustrate the differences between the untreated protein concentrates and trypsin treated samples (4 h), FPLC was utilized (Figure 2). Using an anion exchange column and a linear gradient of NaCl (0-0.6 M) for 40 column volumes (CV), untreated and trypsin treated protein concentrates were analyzed. Figure 2 demonstrated the differences between the two samples clearly pointing out that trypsinolysis took place. In the hydrolyzed sample, a number of new peaks were found to exist. Previously, it was shown that FPLC approach can be utilized in the

fractionation of bioactive peptides and evaluation of their bioactivities including ACE-inhibitory characteristics (Kapel et al., 2006). The values for UV absorbance decreased considerably due to the formation of the new peaks which corresponded to the formation of new peptide fractions. While unbound fractions were detected rapidly prior to the salt gradient, the increasing salt concentrations enabled the elution of various bound fractions.

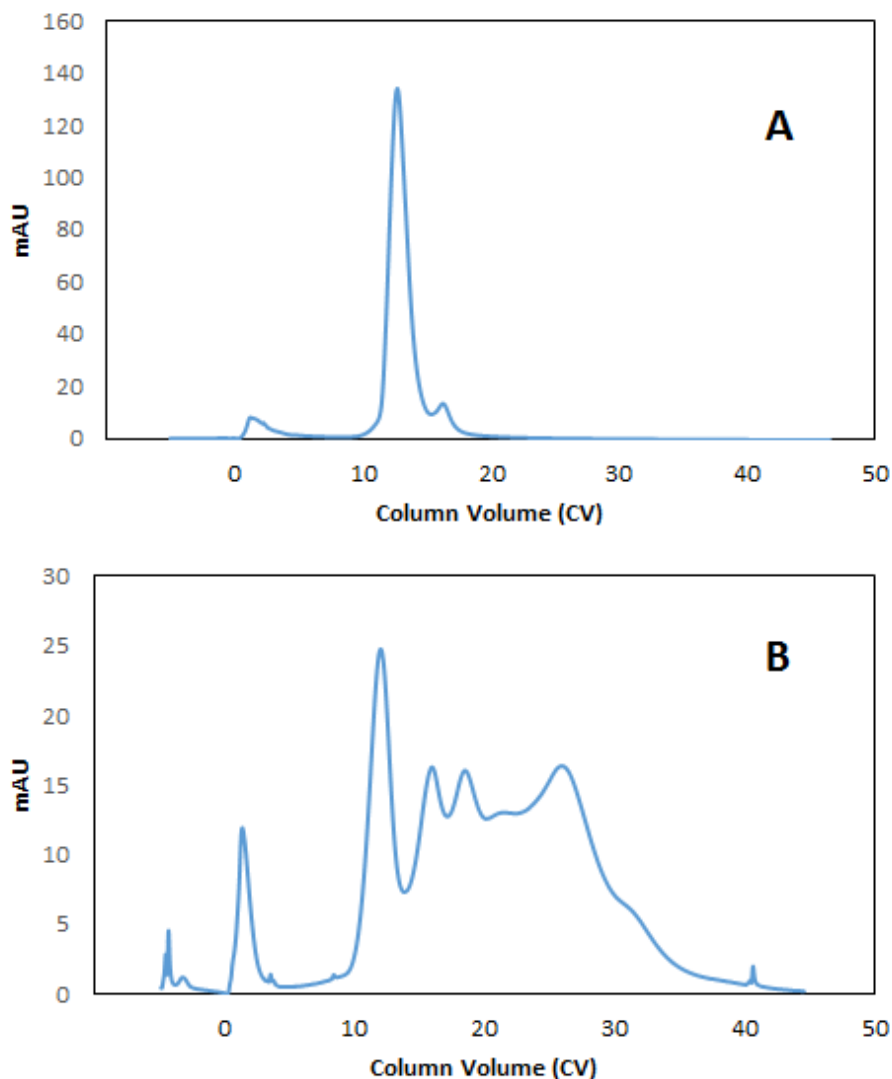


Figure 2. Elution of (A) untreated and (B) trypsin treated hazelnut protein concentrates based on anion exchange separation. Conductivity data was plotted as a function of column volume (0-40 CV).

In order to confirm the data obtained from HPLC-SEC and FPLC analyses, Raman spectroscopy was utilized in the analysis of identical samples (Figure 3). BSA was added as a reference protein to this measurement. Firstly, at all levels of trypsinolysis, the main features in the spectrum were Amide I and III bands and C-C bands. In most cases while the duration of enzymatic treatment increased, the intensity of these bands became more intense possibly indicating that amide bands were more available for detection due to hydrolysis of the proteins.

Amide I band is generally characterized by C-O bond stretching and N-H bond bending in peptides and proteins. In addition, its intensity is

a measure of the presence of α -helical proteins. Increase in the intensity of this band could point out to the fact that during trypsinolysis α -helical content increased for the current samples. Meanwhile Amide III band is characterized by C-N bond stretching and N-H bond bending (Li-Chan, 1996; Herrero et al., 2008a, b). Based on the changes in Amide III band, it might be possible to hypothesize that structural changes including secondary and tertiary level took place due to enzymatic hydrolysis. This could possibly be influential on the biological and technical functionality of the proteins as well, such as their water and/or oil binding, solubility, and hydrophilicity/hydrophobicity characteristics (Herrero et al., 2008a,b).

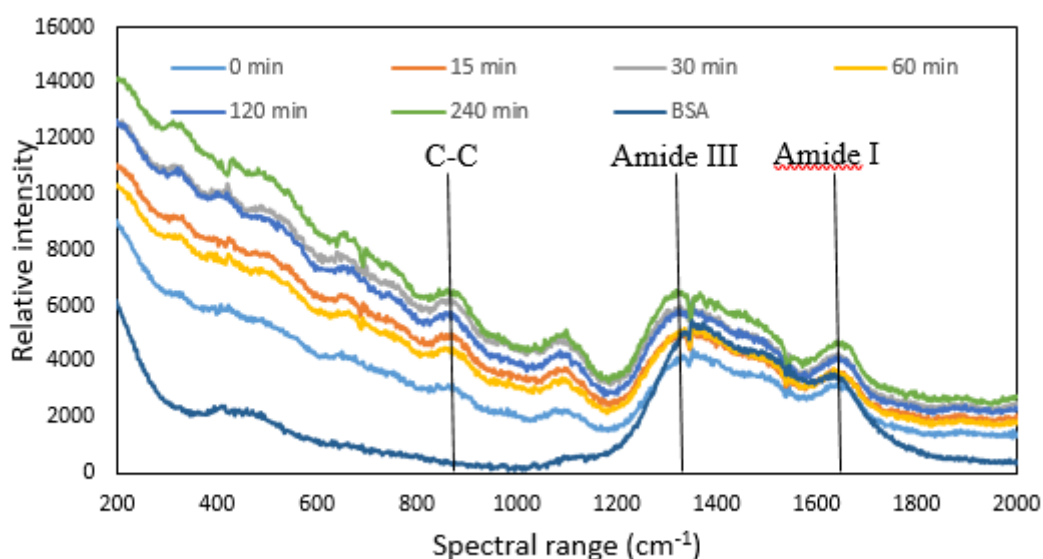


Figure 3. Raman spectroscopy analysis of trypsin treated hazelnut protein concentrates. Enzymatic digestion was carried out at 37°C at an enzyme: substrate ratio of 1:1000 (w/w). In order to enhance the reproducibility, a thermomixer was utilized (1000 rpm). Every curve represented a single time point in trypsinolysis (0, 15, 30, 60, 120 and 240 min). Reference sample was BSA with no trypsin treatment.

Aliquots from tryptic digests studied in the SEC, FPLC and Raman experiments were collected and further investigated in the ACE-inhibition assays (Figure 4). Although small, the untreated protein concentrate demonstrated a limited extent of ACE-inhibitory activity (7.6%). With the increasing extent of hydrolysis (Figures 1), the extent of ACE-inhibitory activity also increased

and reached to about 40% inhibition after 4 h of trypsinolysis (Figure 4). These findings were coherent with our previous findings since most of the ACE-inhibitory peptides were predicted to be di- or tripeptides (Gülseren, 2018), for which becoming dominant in the system might require extended treatments. In the literature, Teh et al. (2016) demonstrated that ACE-inhibitory

activities of hemp protein hydrolysates treated with various proteases generally increased with enzymatic treatment durations up to 4 h. Current data were coherent with these earlier findings, whereas the extent of increase in ACE-inhibitory activities of pinto bean protein hydrolysates were found to be limited beyond 1 h when treated with subtilisins (Garcia-Mora et al., 2015).

All the treatments induced statistically significant differences in ACE inhibition compared to the controls ($P < 0.05$). At the same level, all the treatments also demonstrated significant

differences from each other with the exception of 30 and 60 min samples, which were statistically similar. However, these samples differed from both other treatments and control samples as well ($P < 0.05$). Based on the current results, hazelnut meal could be considered as a valuable source of ACE-inhibitory peptides, and hazelnut consumption could lead to cardioprotective effects due to the combined effects of both its oil and protein fractions. Meanwhile the potential influence of hazelnut proteins and peptides on other bioactivities remain largely unexplored.

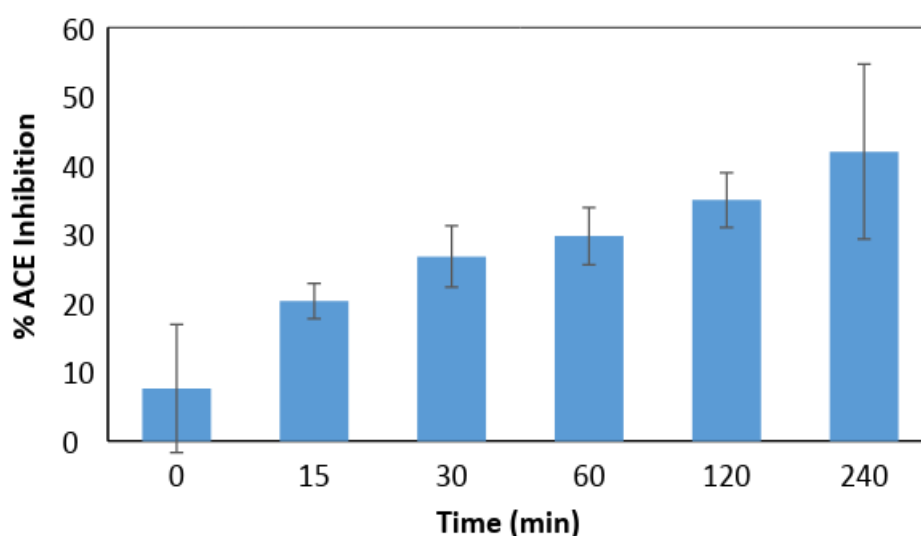


Figure 4. % ACE inhibitory activity of tryptic peptides from the hazelnut protein concentrates as a function of time. % Inhibition was calculated in comparison to a positive control where ACE activity was taken as 100%.

CONCLUSION

In this preliminary report, *in vitro* studies were carried out using hazelnut protein concentrates and a modest extent of ACE-inhibitory activities were detected for all aliquots withdrawn from the trypsinolysis experiments. % ACE-inhibition increased with the extent of trypsin treatment. While studies on other bioactivities remain unexplored so far, we are currently studying the influence of protein isolation methodologies, protein concentrations, and various proteases in order to fully elucidate the bioactive potential of

hazelnut peptides as well as identifying the cardioprotective proteins and peptides from the hazelnuts. Another concern is the reduction of allergenic effects during the enzymatic treatments, which could further enhance the chances of utilizing hazelnut peptides in food formulations. Circulatory system diseases are the primary cause of all death events in Turkey (approx. 40%) (Anonymous, 2015) and many other countries globally, which practically implies the cardioprotective potential of hazelnuts has to be fully exploited.

FUNDING

This work was supported by grants from TÜBİTAK 3501 and 1001 Programmes [grant number 115O569 - 2015-2017 and 217O063 – 2018-2020; The Scientific and Technological Research Council of Turkey]. The authors would like to also express their gratitude to Neva Foods Ltd. (İstanbul, Turkey) for the donation of the deoiled meals.

REFERENCES

- Agyei, D., Danquah, M.K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotech Adv.* 29(3): 272-277.
- Alasalvar, C., Amaral, J.S., Shadidi, F. (2006). Functional lipid characteristics of Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). *J Agric Food Chem.* 54: 10177-83.
- Alasalvar, C., Amaral, J.S., Satır, G., Shadidi, F. (2009). Lipid characteristics and essential minerals of native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.). *Food Chem.* 113: 919-925.
- Alphan, E., Pala, M., Açkurt, F., Yılmaz, T. (1996). Nutritional composition of hazelnuts and its effects on glucose and lipid metabolism. In: IV International Symposium on Hazelnut 445, 305-310, Ordu, Turkey.
- Anonymous (2000). Mortality rate statistics, (2014) (in Turkish). <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18855>. Accessed on: August 2nd, 2017.
- 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 Hydrocoll.* 36: 130-142.
- Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribereau, S., Mondor, M., Farnworth, E., Rjamohamed, S.H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Res Int.* 43(2): 537-546.
- Day, L. (2013). Proteins from land plants—potential resources for human nutrition and food security. *Trends Food Sci. Technol.* 32(1): 25-42.
- De Gobba, C., Tompa, G., Otte, J. (2014). Bioactive peptides from caseins released by cold active proteolytic enzymes from *Arsukibacterium ikekense*. *Food Chem.* 165: 205-215.
- Dogan, A., Siyakus, G., Severcan, F. (2007). FTIR spectroscopic characterization of irradiated hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Food Chem.* 100: 1106-14.
- Erdmann, K., Cheung, B.W., Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J Nutr Biochem.* 19(10): 643-654.
- Flinterman, A.E., Akkerdaas, J.H., Knulst, A.C., Van Ree, R., Pasmans, S.G. (2008). Hazelnut allergy: from pollen-associated mild allergy to severe anaphylactic reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 8(3): 261-265.
- Garcia-Mora, P., Frias, J., Peñas, E., Zielinski, H., Giménez-Bastida, J. A., Wiczowski, W., ... Martínez-Villaluenga, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *J Funct Foods.* 18: 319-332.
- Gülseren, İ. (2018). *In silico* methods to identify ACE and DPP-IV inhibitory activities of ribosomal hazelnut proteins. *J Food Meas Charact.* 12(4): 2607-14.
- Gülseren, İ., Corredig, M. (2013). Storage stability and physical characteristics of tea polyphenol bearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. *J Agric Food Chem.* 61(13): 3242-51.
- Hartmann, R., Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol.* 18(2): 163-169.
- Herrero, A.M. (2008a). Raman spectroscopy for monitoring protein structure in muscle food systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 48(6): 512-523.
- Herrero, A.M. (2008b). Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat and fish: A review. *Food Chem.* 107(4): 1642-51.

- Kapel, R., Rahhou, E., Lecouturier, D., Guillochon, D., Dhulster, P. (2006). Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. *Process Biochem.* 41(9): 1961-66.
- Li, G., Liu, H., Shi, Y., Le, G. (2005). Direct spectrophotometric measurement of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *J Pharm Biomed Anal.* 37: 219-224.
- Li-Chan, E.C Y. (1996). The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends Food Sci Technol.* 7: 361-370.
- Miraliakbari, H., Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chem.* 111(2): 421-427.
- Ortolani, C., Ballmer-Weber, B.K., Hansen, K.S., Ispano, M., Wüthrich, B., Bindslev-Jensen, C., et al. (2000). Hazelnut allergy: a double-blind, placebo-controlled food challenge multicenter study. *J Allergy Clin Immunol.* 105(3): 577-581.
- Ozdemir, F., Akinci, İ. (2004). Physical and nutritional properties of four major commercial Turkish hazelnut species. *J. Food Eng.* 63: 341-347.
- Parcerisa, J., Richardson, D.G., Magdalena, R., Codony, R., Boatella, J. (1997). Fatty acid distribution in polar and nonpolar lipid classes of hazelnut oil (*Corylus avellana* L.). *J Agric Food Chem.* 45: 3887-90.
- 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 Chem.* 115(1): 279-284.
- Tatar, F., Tunç, M.T., Kahyaoglu, T. (2015). Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.) protein concentrates: functional and rheological properties. *J Food Sci Technol.* 52(2): 1024-31.
- Teh, S. S., Bekhit, A.E.D.A., Carne, A., Birch, J. (2016). Antioxidant and ACE-inhibitory activities of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates produced by the proteases AFP, HT, Pro-G, actinidin and zingibain. *Food Chem.* 203: 199-206.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr.* 92: 357-366.
- Vieths, S., Reindl, J., Müller, U., Hoffmann, A., Haustein, D. (1999). Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple *in vitro* procedure. *Eur Food Res Technol.* 209(6): 379-388.

EK-3



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

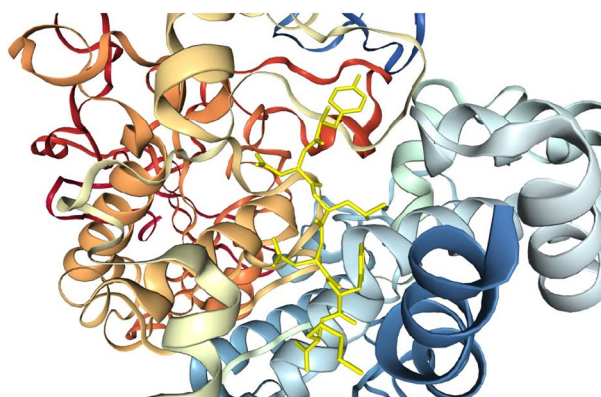
İnci Zent¹ · Ayşe Gülden Göksu¹ · Bilal Çakır^{2,3} · İbrahim Gülseren^{1,4} 

Received: 30 May 2020 / Accepted: 14 September 2020 / Published online: 25 September 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Black cumin (*Nigella sativa* L.) is a seed that has been utilized in traditional medicine due to the bioactive characteristics of seed oil and therein solubilized components. In the present study, using enzymatic proteolysis (0–2 h) and fast protein liquid chromatography (FPLC)-based fractionation techniques, trypsin and papain hydrolysates of black cumin protein concentrates were investigated for their dual antioxidative and acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activities. Peptides in the active fractions were identified using a liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-TOF/MS) based analytical method, which further facilitated the in silico prediction of bioactivity for each and every characterized peptide sequence. While the extent of AChE inhibitory activity mostly decreased with proteolysis, various antioxidative activities increased during proteolytic treatments. Based on their relatively higher activities, 30 min papain treated hydrolysates were fractionated into four major fractions and their antioxidative capacities were verified in vitro. Peptide profiles of the fractions were investigated by LC-Q-TOF/MS analysis. Twenty different peptide structures were identified and their potential bioactivities were verified in silico. The interactions of the sample peptides with AChE were simulated via molecular docking. While anionic peptides were generated in this study, hydrophobic interactions possibly played a pivotal role in their dual bioactivities (i.e., AChE inhibitory and antioxidative) and peptide length could also be influential.

Graphic Abstract



Keywords Black cumin · Bioactive peptides · LC-Q-TOF/MS · In silico analysis · AChE-inhibitory activity · Molecular docking

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11694-020-00666-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Extended author information available on the last page of the article

Introduction

Bioactive peptides are protein fragments that have positive effects on body functions. Based on their potential influence, they can be classified as anti-microbial, anti-thrombotic, anti-hypertensive, opioid, immunomodulatory, mineral binding and antioxidative peptides etc. They are normally hidden in the parent protein and often need to be extracted out of their sequence to demonstrate activity [1]. The manufacture process for these peptides may require fermentation, various food processing operations or enzymatic proteolysis [2]. Once an appropriate food protein source has been identified for the manufacture of bioactive peptides, utilization of a single protease or multiple proteases to release the peptides of interest is a commonly practiced method [3]. Food proteins can be hydrolyzed using proteases such as trypsin, pepsin, chymotrypsin, bromelain, ficin, or papain to obtain bioactive peptides [4]. Valorization of industrial by-products is a relatively economic route to generate bioactive peptides. For example, antioxidative and antihypertensive peptides were obtained from by-products of olive oil production [5].

Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme that degrades acetylcholine to acetic acid and choline. During the progression of Alzheimer's disease (AD), the activity of AChE increases in the brain which in turn leads to reduction in nerve conduction [6]. Therefore, inhibition of AChE has become one of the most widely used treatment options for AD [7].

Antioxidants from various sources play an important role in the prevention of cancer and cardiovascular diseases and in the reduction of the incidence of many other diseases including diabetes, cancer, schizophrenia, and AD [8]. It would be advantageous when an agent used against AD could also perform antioxidative effects [6]. In commercial uses, furthermore, natural antioxidants may be preferred due to their consumer appeal. Natural bioactive peptides with dual functionalities (i.e., AChE inhibitory and antioxidative) might be utilized in value-added formulations including functional foods and food supplements.

Black cumin (*Nigella sativa* L.) has been accepted as a medicinal plant due to some of its valuable components [9]. It is cultivated in many countries including Turkey and Eastern Mediterranean regions and has traditionally been used as an herbal medicine [10]. Previous studies have also shown that black cumin extracts demonstrated antimicrobial activity [11]. Its bioactive properties mostly originated from the presence of thymoquinone and essential oils [12, 13]. Recently, black cumin oil has become one of the most frequently used substances in food and health applications. Many biological activities have been attributed to black cumin seeds possibly indicating that

black cumin components other than seed oil could also demonstrate bioactivities [9].

The consumption of black cumin seeds at reasonably high quantities is relatively difficult. Hence, the generation of functional or therapeutic components from the seeds could enhance their technical and biological potential. For example, protein concentrates and their derivatives could extend the functionality of seeds in industrial products [14, 15].

In this study, identification of the bioactive potential of black cumin protein hydrolysates and their corresponding active sequences were targeted using in vitro assays, in silico analysis techniques and mass spectrometry analyses which linked the two sets of findings. The aim of these studies included both the valorization of an industrial by-product and exploration of bioactive potential for future commercial uses.

Material and methods

Materials

Cold press deoiled black cumin cakes were donated by a local company that produces cold press oils (Oneva Foods, İstanbul, Turkey). The maximum temperature applied in cold press processing was < 40 °C in all of the cases, which limited the extent of lipid oxidation in the samples (data not shown). All the chemicals used in this study were obtained from Sigma-Aldrich Corp (Schnelldorf, Germany).

Methods

Preparation of protein concentrates

Protein concentrates were obtained from deoiled cakes using an alkali extraction-isoelectric precipitation technique [14]. Firstly, the size of the cake samples was reduced using a blender and the powdered samples were mixed with water (1:15 by mass; sample: water). The medium pH was set to pH 9.5 (1 M NaOH) to ensure solubilization of protein molecules and the mixture was kept stirred using a magnetic stirrer for 1 h. The resulting dispersion was centrifuged (HITACHI, CR22N) at 15000×g for 1 h (4 °C) to separate the undissolved matter. Medium was brought down to pH 4.5 using 1 N HCl and isoelectric precipitation was promoted. To ensure the separation of undissolved materials, centrifugation was administered under identical conditions as the previous centrifugation step. The precipitated proteins were collected and stored at -20 °C until lyophilization. Frozen samples were lyophilized using a Teknosem TRS 2/2 V instrument (Teknosem Corp., İstanbul, Turkey). The lyophilized samples were also stored at -20 °C until hydrolysis.

Protein contents of the lyophilized samples were determined based on the Kjeldahl method [15].

Proteolytic hydrolysis of protein concentrates

Proteolytic hydrolysis was performed using trypsin and papain enzymes [16]. Trypsin is a serine protease that cleaves proteins primarily at Arg-X and Lys-X regions [17]. Papain is an endolytic cysteine protease that cleaves peptide bonds containing basic amino acids (arginine, lysine and phenylalanine) [18]. An aqueous dispersion (1%) of black cumin protein concentrate was prepared in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7) using a magnetic stirrer (1 h, 25 °C). Then the dispersion (20000xg for 10 min) was centrifuged to separate the insolubles. The supernatant was transferred to Eppendorf tubes at an enzyme:protein ratio of 1:1000 for both enzymes and enzymatic hydrolysis was performed for 2 h using a thermomixer (MIULAB MTC-100 Thermo Shaker Incubator, 37 °C, 1000 rpm). In order to stop the enzymatic activity, the tubes were transferred to a 95 °C water bath. The hydrolysates were then quickly cooled using ice until the sample temperature reached to the ambient temperature. Once again, insolubles were separated using a microcentrifuge (Neuaton, i Fuge M08). Finally, all samples were passed through cellulose acetate syringe filters (0.45 µm) and stored at -80 °C until further analyses.

Acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity test

AChE inhibitory activity test was used to examine potential anti-Alzheimer effects of the obtained protein concentrates and hydrolysates. An aliquot of each sample (10 µl) was mixed with 150 µl of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8), and 1 ml of AChE enzyme solution (0.1 units.ml⁻¹). The mixture was kept incubated at 25 °C for 15 min on the thermomixer (1000 rpm). Subsequently, 10 µl 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) solution (10 mM) and 10 µl of acetylthiocholine iodide (ATCI) solution (14 mM) were added and the color product formation was observed. After 10 min, absorbance measurements were performed at 412 nm [6].

Antioxidative activity tests

Various antioxidative activity tests were carried out to elucidate the potential mechanisms of oxidative reactions.

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay

DPPH radical is a synthetic radical used to measure the free radical removal activity of compounds with antioxidative potential [19]. Ethanolic DPPH solution yields purple color, which is discolored by the antioxidants. Hydrolysate samples

(0.1 ml) were mixed with 0.1 ml of DPPH solutions (53 mg DPPH. L⁻¹ methanol). Samples containing only peptide preparation buffer, DPPH with buffer, DPPH with enzyme and DPPH with protein were also prepared for measurements as standards and references. All samples containing DPPH were incubated in the dark for 15 min before measurements. Then, absorbance measurements were performed at 515 nm [20, 21]. Inhibitory capabilities of the samples were evaluated in comparison to the control samples.

Iron chelation activity assay

In the iron chelation activity test, ferrozine, which is a strong iron binding reagent, and the sample to be analyzed are mixed in the presence of Fe²⁺ ions to compete for iron binding [21]. The Fe²⁺/ferrozine complex yields a strong red color and its intensity decreases as the complex formation is prevented by inhibitors [22]. In accordance with Ebrahimzadeh et al. [23], the capacity of black cumin proteins and peptides to chelate Fe²⁺ ions was determined. 0.5 ml of hydrolyzed peptide dispersions (02 h) were mixed with 1.6 ml of water and 0.05 ml of 2 mM FeCl₂. After 30 s of incubation at ambient temperature, 0.1 ml of 5 mM ferrozine was added to the mixture and incubated for 10 min in the dark. The absorbance of Fe²⁺-ferrozine complex was measured at 563 nm. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (0.2 mg.mL⁻¹), the most powerful iron chelator known, was a positive control in the evaluation of the chelation activity. Buffer, enzyme and protein concentrate samples were also measured as references or blanks.

Hydroxyl radical scavenging activity assay

Hydroxyl radical (OH⁻) is the free radical that forms through the reduction of hydrogen peroxide and has the highest toxicity due to its high reactivity [24]. Since it is characterized with a short half-life, hydroxyl radical can cause great damage and lead to the formation of other radicals [25]. In this assay, an aliquot from 10 mM FeSO₄ solution (0.1 ml), 0.1 ml of 10 mM EDTA, 0.5 ml of 10 mM α-deoxyribose, 0.9 ml of potassium phosphate buffer solution (pH 7) and 0.2 ml of protein or peptide dispersions were mixed. 0.2 ml of 10 mM H₂O₂ was added to this mixture and the samples were incubated for 1 h at 37 °C (1000 rpm). Afterwards, 1 ml 2.8% trichloroacetic acid (TCA), and 1 ml 1.0% thiobarbituric acid (TBA) were added to the sample tubes and the samples were kept in a boiling water bath for 15 min. Absorbance values were measured at 532 nm when samples were cooled to ambient temperature. Similarly, absorbance values for the buffer solution and enzymes were measured in the absence of protein or peptide samples [26].

Fractionation of protein hydrolysates

Since the highest signal intensity and antioxidative activity were mostly observed in 30 min papain treated hydrolysates, these samples were used in the fractionation experiments. Black cumin protein hydrolysates were separated using 1 ml Capto DEAE (i.e., weak anionic) column at a rate of 1 ml per minute based on various pre-trials and fractionated using ÄKTA Pure 25 L (GE Life Sciences, Sweden) FPLC system supplied with UV and conductivity detectors. A 0–100% salt gradient (i.e., 0–1 M) was administered over 35 CV (column volumes), where 20 mM Tris–HCl (pH 8.0) sample buffer and 1 M NaCl containing identical Tris–HCl elution buffer were utilized. Fractions were collected by an automatic sampler and cationic peptides were mostly discarded in the waste stream [27].

LC-Q-TOF/MS analysis of hydrolysate fractions

Hydrolysate samples were incubated with 10 mM dithiothreitol (DTT) at 55 °C for 10 min to ensure the reduction of the peptides. The reduced peptide mixtures were then alkylated with 20 mM iodoacetamide (IAA) in the dark at ambient temperature conditions. Samples were filtered through 30 kDa filters. Peptide concentration of the samples was determined and the samples were taken into vials for LC-Q-TOF/MS analysis at 1 mg per injection. Prior to the analyses, the detector and calibration settings were made via MassLynx program specific to the Xevo G2-XS QToF device (Waters). The peptide fractions were further fractionated with an acetonitrile gradient (535%) in an HSS T3 column based on their hydrophobicity and the separated peptides were analyzed by mass spectrometry upon electrospray ionization. MS analysis was performed for 0.7 s and information was collected about the entire peptide. Afterwards, MS/MS analysis was performed for 0.7 s and the peptide fragmentation and sequence information was obtained. Peptides and proteins were identified using ProteinLynx Global Server (PLGS 3.0) software. Analysis was performed using the appropriate databanks for each sample type. The selected parameters for PLGS were based on the default settings of Labmed, Acıbadem University, İstanbul, Turkey where all the LC-Q-TOF/MS analyses were carried out.

In silico analyses and molecular docking

Upon the acquisition of MS-data, the determined peptide sequences were analyzed in silico for the prediction of their physicochemical and bioactive characteristics. Firstly, the isoelectric point, charge and toxicity assessment of the peptides were analyzed based on the work of Gupta et al. [28]. The probability of peptide sequences being bioactive was determined by PeptideRanker [29]. Finally, in cases where

bioactivity was observed and these observations were supported by in silico calculations, the interactions between the respective peptides and the enzyme they inhibit (i.e., AChE from human) were analyzed based on the method of Trabuco et al. [30]. Using a molecular docking approach, peptide-protein interactions were also studied via HPEPDOCK, which generated docking scores and 3D protein-peptide interaction images [31]. In order to analyze the influence of the current hydrolysates in the human body, ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity) properties of the hydrolysates were studied in silico [32].

Statistical analysis

The data collected in all of the experiments were reported as sample means \pm standard deviation based on at least triplicate experiments. Whether differences existed between various treatments were studied based on statistical significance ($p \leq 0.05$).

Results and discussion

Acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity tests

Black cumin protein concentrate dispersions (1%) were subjected to proteolytic hydrolysis with papain and trypsin. The potential anti-Alzheimer activity of the hydrolysates were analyzed based on their acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activities, as previously reported by Şenol et al. [6]. The results for these tests were summarized in Fig. 1. Firstly, black cumin protein concentrates demonstrated mild AChE inhibitory activities ($28.72 \pm 1.8\%$) prior to hydrolysis. For papain hydrolyzed samples, inhibitory activity gradually decreased in comparison to non-hydrolyzed concentrates.

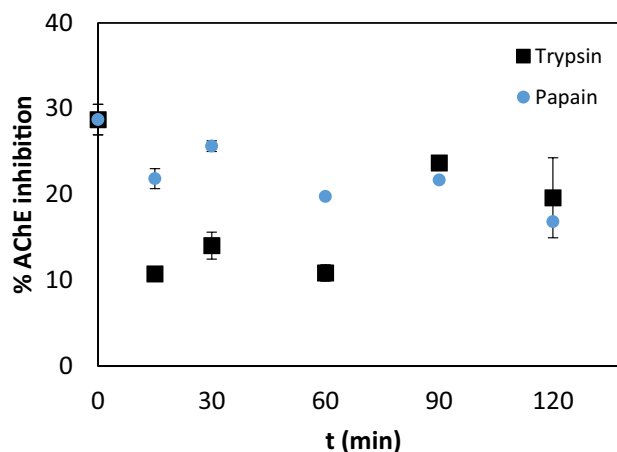


Fig. 1 AChE inhibitory activities of trypsin or papain treated (0–2 h) black cumin protein hydrolysates

Over a 2 h hydrolysis procedure, % inhibition values dropped down to approx. 16.8%. For the trypsin hydrolyzed samples, the relation between hydrolysis duration and % inhibition was not clear. An average value of approx. 17.5% was attained for all trypsin treatments. Consequently, in both cases, it was not possible to enhance the inhibitory activity based on enzymatic treatments and the concentrates performed as better AChE inhibitors than the hydrolysates, while the unprocessed concentrates were reasonably effective in AChE inhibition. Previously, the molecular sizes of peptides were found to be influential on the AChE inhibitory characteristics of hemp seed protein hydrolysates [33], which in turn might partly explain the reduction in AChE inhibitory characteristics of the black cummin protein hydrolysates. In most cases, the concentrates and hydrolysates generated a moderate AChE inhibitory effect, while the average AChE inhibitory activity of papain hydrolysates were slightly higher than that of trypsin hydrolysates.

Antioxidative activity assays

In this study, multiple antioxidative tests were carried out to determine the antioxidative performance of black cummin protein concentrates and their hydrolysates against various oxidative radicals. Black cummin protein concentrates treated with papain or trypsin enzymes were studied using DPPH inhibition, iron chelation and hydroxyl radical scavenging activity tests.

DPPH inhibitory activity assay

The antioxidative potential of the protein hydrolysates and fractions were analyzed based on the DPPH inhibition for the samples hydrolyzed with papain or trypsin. The results were summarized on Fig. 2a. DPPH inhibitory activity of the non-hydrolyzed protein concentrate was found to be approx. 30.4%. In papain hydrolysates, the activity generally increased with proteolysis duration. The highest activity was obtained from the concentrate which was hydrolyzed for 120 min (approx. 59.8%), while the results for 30 min were comparable at 52.8% inhibition. In trypsin hydrolysates, after 15 min, % inhibition was 41.7%. Beyond 15 min, no further increases in activity were recorded. In summary while increases in proteolysis duration enhanced activity for papain hydrolysates, that was not necessarily the case for trypsin hydrolysates treated beyond 15 min.

Iron chelation activity assay

Iron chelation activity of black cummin protein concentrate dispersions and their hydrolysates were analyzed after treatment with papain and trypsin (0–2 h) (Fig. 2b). Once again, in papain hydrolysates, iron chelation activity generally

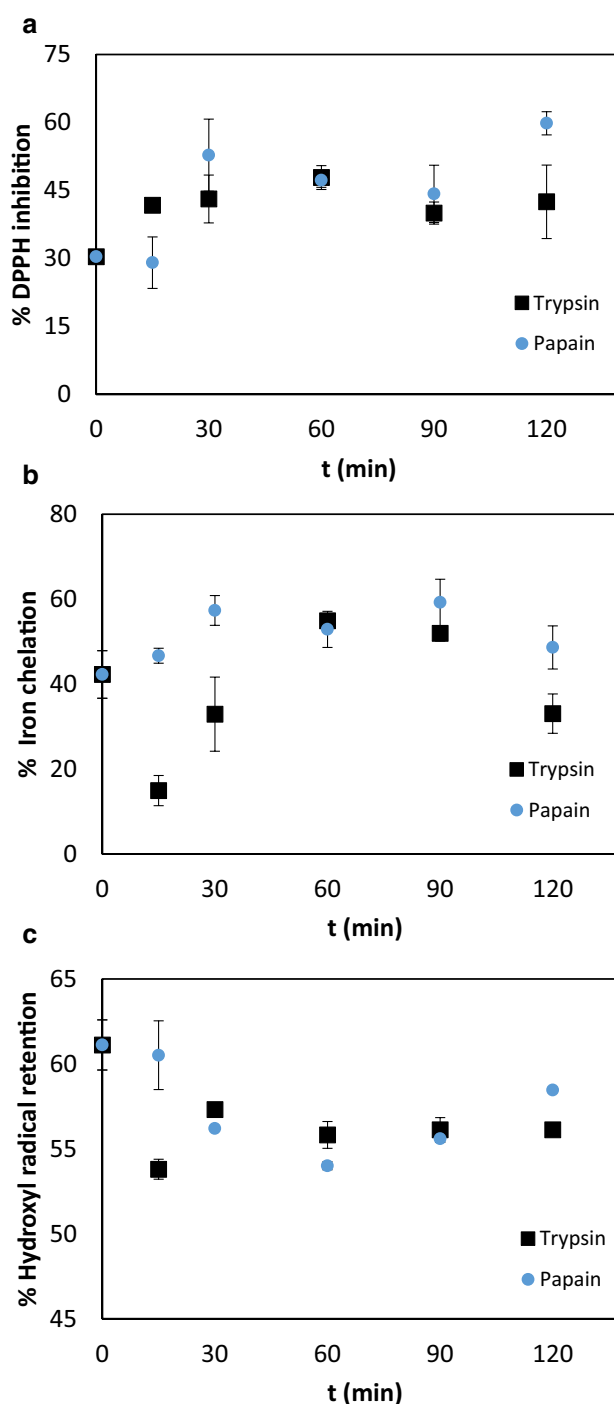


Fig. 2 a % DPPH inhibition, b % iron chelation activity, and c % hydroxyl radical scavenging activity of black cummin protein concentrates and hydrolysates (0–2 h) treated with papain or trypsin

increased with proteolysis duration. In most cases, the activity accounted for approx. 50% between 15 min and 2 h. In terms of shorter processing durations, the optimal activity could be attained after 30 min of papain hydrolysis (57.33% ± 3.5). The hydrolysis duration was not highly

correlated with the iron chelation activity in trypsin hydrolysates (Fig. 2b). While non-hydrolyzed protein concentrates demonstrated an activity level of $42.27\% \pm 5.6$, and the highest activity was observed after 60 min ($54.91\% \pm 1.5$), further extension of hydrolysis treatment reduced the activity of the hydrolysates down to about 33%. Iron chelation activity test performed with EDTA (0.2 mg.ml^{-1}) demonstrated $89.03 \pm 4.1\%$ chelation activity. These results showed that although they are not as effective as EDTA, black cummin protein concentrates and their hydrolysates acted as natural antioxidants with iron chelating potential.

Hydroxyl radical retention activity test

The hydroxyl radical retention activities of the black cummin protein concentrate dispersions and their hydrolysates were measured (Fig. 2c). Non-hydrolyzed black cummin protein concentrate was observed to demonstrate a hydroxyl radical retention activity of $61.12 \pm 1.5\%$. Papain hydrolysis generally leads to moderate reduction in the activity. Consequently, non-hydrolyzed concentrates were mostly higher in activity compared to the papain hydrolysates. Similar results were obtained for trypsin hydrolysates, although the extent of reduction in activity was mostly slight. In this test, hydroxyl radical is produced in vitro by reaction of Fe^{2+} and H_2O_2 and the hydroxyl radical retention activity of the tested sample is measured. The samples exhibiting antioxidant activity may also indirectly inhibit the formation of hydroxyl radicals by chelating the Fe^{2+} ion. Therefore, a good chelation or hydroxyl radical retention effect of the tested sample cannot be fully distinguished [25].

In order to enhance the antioxidative attributes of the protein hydrolysates, samples that demonstrated antioxidative activity were subjected to FPLC-based fractionation. In all antioxidative activity tests, maximum antioxidative activity of the hydrolysates was mostly obtained after 30 min of papain treatment. Consequently, fractionation was primarily carried out for 30 min papain hydrolysates.

DPPH inhibitory activity of the hydrolysate fractions

After a number of fractionation pre-trials with weak anionic, strong anionic or cationic columns (data not shown), the most intense peptide signals were obtained upon utilization of HiTrap Capto DEAE anion exchange column, which is a weak anionic column. Papain hydrolysates (P) were fractionated over a linear salt gradient and the major peaks in the chromatogram were divided equally into 4 major fractions named as PA, PB, PC, and PD (Fig. 3). In order to determine the corresponding antioxidative activities of the fractions, DPPH inhibitory activity tests were administered (Fig. 4). As the overall volume in the fractions was higher than the injected hydrolysate samples, peptide concentrations in the

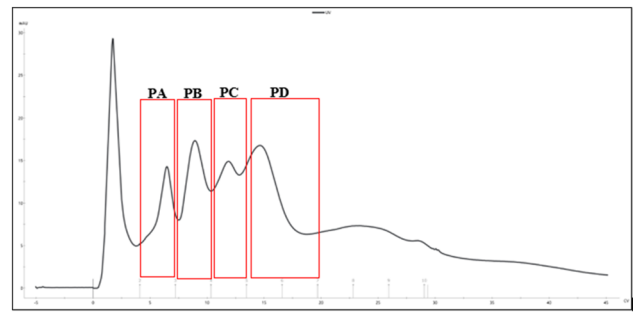


Fig. 3 Fractionation of papain treated (30 min) black cummin protein concentrates using a 1 ml HiTrap Capto DEAE weak anionic column, where a 0–100% salt (1 M NaCl) linear gradient was administered over 35 column volumes

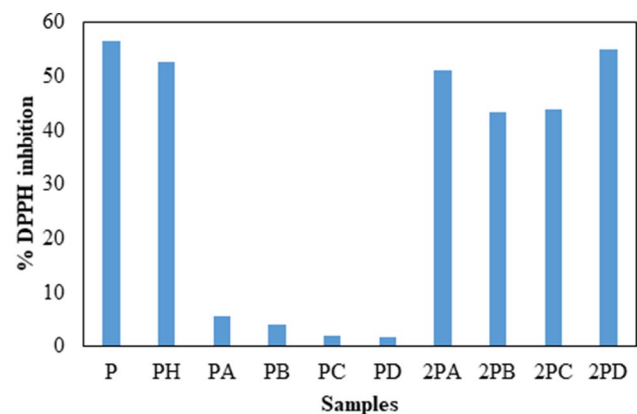


Fig. 4 DPPH inhibitory activities (%) of black cummin protein concentrates (P), their papain treated (30 min) hydrolysates and their corresponding fractions (PA, PB, PC and PD). In addition, hydrolysate volumes in the DPPH assay mixtures were doubled (2PA, 2PB, 2PC and 2PD) to investigate concentration dependence. Standard deviation was $<5\%$ of the sample mean in all cases

fractions can be anticipated to decrease. Consequently, the DPPH inhibitory activity of the fractions were lower compared to that of non-hydrolyzed concentrates. The highest activity was attained by the PA fraction which was the weakest anionic fraction. To ensure the presence of antioxidative capacity in the samples, a second set of DPPH analyses was carried out. In this case, twice the volume of hydrolysates was added to the assay medium to test the validity of findings. In all cases, fractions demonstrated significantly higher DPPH-inhibitory activity compared to the previous tests. These findings might be attributed to the relatively low concentrations of peptides in the fractionated hydrolysates. The double volume samples (2PA, 2PB, 2PC and 2PD) demonstrated DPPH inhibitory activities (%) of 51.2, 43.4, 43.9, and 55.1%, respectively. While the concentration, anionic behavior and composition of the samples might be quite different, the inhibitory activity of each and every

fraction was comparable to that of the non-hydrolyzed protein concentrates.

Mass spectrometry and in silico analyses

Active fractions from papain treated hydrolysates were analyzed using an LC-Q-TOF/MS methodology and a sample spectrum is shown on Figure S1 of Supplementary Data. Among these fractions, 20 different spectra were generated and the spectral data were matched to the peptide structures listed in Uniprot and PLGS databanks in order to elucidate the sequences of active peptides. The determined sequences were listed in Table S1 of Supplementary Data along with their calculated physicochemical characteristics and bioactive potential.

As detailed on Table S1, none of the black cumin peptides identified here were found to be toxic agents in silico and pI values of these peptides were in the range of approx. pH 4.7 [28]. Since the majority of these peptides were not located in current databases, some of our findings possibly pointed out to novel proteins or peptides. This is not surprising since the current findings on black cumin proteins are mostly scarce [15]. Among the 20 different peptides listed on Table S1, 3 of them (ASADTSNTGSVSEANAQYYQQEAGKLLK, YDLDFK, PICESLNILEYIDEIWPHNR) were found to demonstrate a PeptideRanker score > 0.5 indicating potential bioactivity which supported the in vitro findings. Thus, while the current peptides demonstrated antioxidative and/or AChE inhibitory activity in vitro, PeptideRanker [29] showed that some of them could demonstrate bioactivity.

Based on these findings, the potential interaction of a sample peptide (YDLDFK, PeptideRanker score > 0.5) with AChE was investigated in silico [30]. The findings are listed on Figure S2 of Supplementary Data and Table 1. Figure S2 demonstrated the interaction mechanism of the peptide and AChE visually, while Table 1 summarized which residues on AChE were likely to bind to the potentially inhibitor peptide. Consequently, in silico techniques predicted the probability of binding between the potential inhibitor and AChE enzyme was significant ($p \leq 0.05$) (Figure S2). According to the most probable model, 5 amino acids in YDLDFK peptide were predicted to actively bind AChE, while 12 potential binding sites existed on AChE for YDLDFK binding which in turn could cause inhibition. It should also be noted that human AChE consists of 614 amino acids, which demonstrates

the relative effectiveness (i.e., 12 potential site among 614 amino acids) of the model.

Furthermore, protein-peptide interactions were studied through a molecular docking approach [31]. While information about the binding site can be predicted by global peptide interaction algorithms such as PepSite [30], HPEPDOCK can be utilized for local peptide interactions, where binding modes can be obtained by high resolution within the binding site. Table 2 and Fig. 5 demonstrate the docking scores and high resolution images of the most probable interaction models, respectively. In all cases, a significant interaction was predicted between the peptides and AChE.

ADMET properties

ADMET properties of the potentially bioactive black cumin peptides were investigated [32]. In terms of absorption characteristics (Table 3), these peptides could not penetrate the blood–brain barrier (BBB) or demonstrate Caco-2 permeability. However, they could potentially be absorbed in the human intestinal absorption (HIA) system enhancing their chances of demonstrating bioactivity.

In terms of metabolism characteristics (Table 3), these peptides were mostly not substrates or inhibitors for Cytochrome P450 (CYP450) enzymes. The only exception was that they could potentially serve as a substrate for CYP450 3A4 enzyme.

Table 2 Docking scores of the predicted protein-peptide interactions (A: YDLDFK, B: PICESLNILEYIDEIWPHNR and C: ASADTSNTGSVSEANAQYYQQEAGKLLK)

Rank	Docking score-A	Docking score-B	Docking score-C
1	-173.050	-196.728	-188.242
2	-152.999	-189.498	-188.138
3	-152.466	-188.632	-185.240
4	-150.510	-186.037	-178.919
5	-148.780	-185.870	-177.819
6	-146.714	-182.937	-174.402
7	-146.642	-182.553	-170.679
8	-145.991	-182.372	-164.531
9	-145.886	-181.755	-163.081
10	-144.130	-175.471	-161.933

Table 1 List of the major amino acids in which YDLDFK peptide interacts with AChE

Sequence	Active amino acids	P-value	Potential binding sites on AChE
YDLDFK	Tyr-1 Leu-3 Asp-4 Phe-5 Lys-6	0.0005206	Tyr72, Asp74, Gly82, Trp86, Tyr124, Trp286, Phe297, Tyr337, Phe338, Tyr341, Tyr439, Met443

The most probable model (Model 1) was used

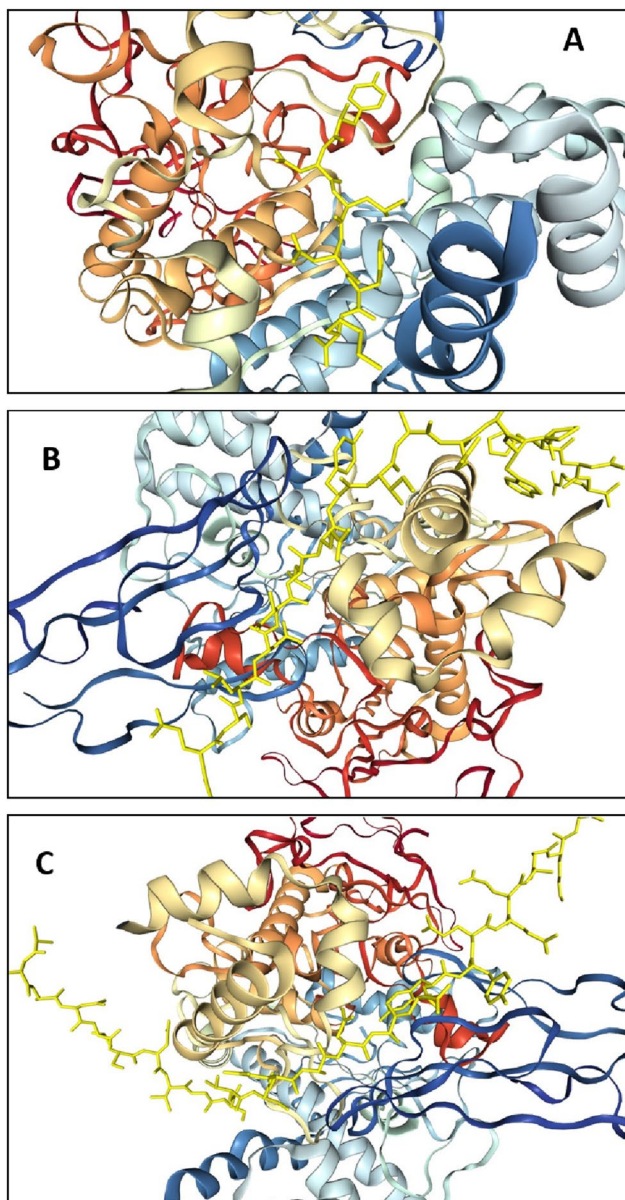


Fig. 5 Visual schematization of the interaction of the highest Peptide Ranker value peptides in each and every enzymatic digest with AChE. Molecular docking via HPEPDOCK was carried out for **a** YDLDFK, **b** PICESLNILEYIDEIWP HNR and **c** ASADTSNTGVSVEANAQYYQQEAGK LK peptides. The most probable model (Model 1) was used in all cases

Finally, none of the peptides were classified as carcinogens by the admetSAR system [32]. Based on these findings, papain hydrolysates generated from black cumin protein concentrates are well-tolerable, potentially non-toxic, non-carcinogenic components which do not or minimally affect the usual metabolism or pharmacokinetics of medicinal components. Meanwhile intestinal uptake capabilities seem to be present in the human body.

Discussion

In the previous studies, a novel peptide from *Ziziphus jujuba* fruits was shown to demonstrate both AChE inhibitory and antioxidative characteristics [34]. Furthermore, a pentapeptide (EQRPR) obtained from rice bran potentially possessed protective capabilities against Alzheimer's disease since the reduction in cell cytotoxicity was achieved on amyloid-induced neuronal cells [35]. Consequently, plant protein hydrolysates seem to be a rational source of AChE inhibitory and/or antioxidative active agents. Zare-Zardini et al. [34] indicated that dual bioactivity (i.e., cholinesterase inhibitory and DPPH scavenging activities) could be attributed to the hydrophobic characteristics of their active peptide (i.e., Smakin-Z), which consisted of approx. 80% of neutral and hydrophobic residues [36].

The three peptides investigated in detail here have anionic characteristics as anticipated by the separation method utilized (i.e., anion exchange) and demonstrated by their calculated pI values. Under most physiological pH conditions, negative charge potentially carried by these peptides could affect their interactions with AChE and their binding capabilities to positively charged metal ions, which otherwise could promote oxidative reactions. It is noteworthy that potential binding sites of YDLDFK peptide summarized on Table 1 consisted of 50% neutral, 41.67% hydrophobic and 8.33% acidic (i.e., 1 in 12) residues implying that electrostatics were possibly secondary in this potential interaction. Similar to Snakin-Z, other peptides listed on Table S1 (ASADTSNTGVSVEANAQYYQQEAGK LK and PICESLNILEYIDEIWP HNR) demonstrated roughly 70% and 80% of combined neutral and hydrophobic residues, respectively. It must be noted that in various cases, bioactive peptides with acetylcholinesterase inhibitory activities were characterized with relatively high molecular weights similar to the current peptides (for example, Ahn et al. [37]). Both ideas were coherent with the findings of Malomo and Aluko [38], which also pointed out to the presence of hydrophobic residues in their AChE inhibitory fractions prepared through reverse phase HPLC based separation and located up to 11 amino acid active peptides in these fractions.

Our group previously found out that black cumin protein concentrates and their corresponding hydrolysates demonstrated moderate ACE-inhibitory activities [14]. Here we have effectively demonstrated in silico and in vitro that these hydrolysates also possessed antioxidative and anti-AChE characteristics. Collectively the data point out to the fact that black cumin proteins and their hydrolysates have a good potential in the generation of bioactive components.

Table 3 Critical ADMET parameters for the most probable bioactive peptides among the identified peptides

		ASADTSNTGVSVE- ANAQYYQQEAGKLK	YDLDFK	PICESLNI- LEYIDEI- WPHNR
	Blood–Brain barrier	–	–	–
Absorption	Human intestinal absorption	+	+	+
	Caco-2 permeability	–	–	–
	CYP450 2C9 substrate	Non-substrate	Non-substrate	Non-substrate
	CYP450 2D6 substrate	Non-substrate	Non-substrate	Non-substrate
	CYP450 3A4 substrate	Substrate	Substrate	Substrate
Metabolism	CYP450 1A2 inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor
	CYP450 2C9 inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor
	CYP450 2D6 inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor
	CYP450 2C19 inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor
	CYP450 3A4 inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor
Toxicity	Carcinogens	Non-carcinogens	Non-carcinogens	Non-carcinogens

Conclusion

In terms of sustainability, valorization of industrial and/or agricultural byproducts is of paramount importance and their utilization exploits the potential to generate value added products and benefit human health. Here, we made an effort to generate peptides with dual (antioxidative and acetylcholinesterase inhibitory) functionality from industrially cold pressed black cumin cakes using enzymatic hydrolysis and FPLC-based fractionation. The protein concentrates, their hydrolysates and corresponding peptide fractions were observed to demonstrate antioxidative and/or AChE inhibitory activity to varying extents. Mass spectrometry was instrumental in linking the in vitro findings to the determination of specific and effective peptide sequences, for which the individual potential activities were also predicted in silico. Bioactive peptides obtained from deoiled black cumin cakes could facilitate the generation of value-added products through further studies. MS based identification of active black cumin peptides could lead the path to the design of functional agents that can be utilized in functional foods, food supplements and pharmaceutical formulations.

Acknowledgements Cold-press deoiled black cumin cakes were donated by Oneva. This study was funded partly by a grant from TÜBİTAK 1001 program, Turkey (Grant No. 217O063). The MS analyses were carried out at Labmed, Acıbadem University, İstanbul, Turkey. The authors would like to thank Prof. Dr. Ahmet Tanık Baykal and Ms. Emel Akgün for their technical support at Labmed.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest None.

References

1. H. Korhonen, A. Pihlanto, Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* **16**, 945–960 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>
2. R. Hartmann, H. Meisel, Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotech* **18**, 163–169 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.copbi.2007.01.013>
3. C.C. Udenigwe, R.E. Aluko, Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *J. Food Sci.* **71**, 11 (2012). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.2011.02455.x>
4. S. Chakrabarti, S. Guha, K. Majumder, Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. *Nutrients* **10**, E1738 (2018). <https://doi.org/10.3390/nu10111738>
5. C. Esteve, M.L. Marina, M.C. García, Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food Chem.* **167**, 272–280 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.090>
6. F.S. Şenol, I. Orhan, F. Celep, A. Kahraman, M. Doğan, G. Yılmaz, B. Şener, Survey of 55 Turkish salvia taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. *Food Chem.* **120**, 34–43 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.066>
7. G. Orhan, I. Orhan, B. Sener, Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease. *Lett. Drug Des. Discov.* **3**, 268–274 (2006). <https://doi.org/10.2174/157018006776743215>
8. S. Chakrabarti, F. Jahandideh, J. Wu, Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *Biomed. Res. Int.* (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/608979>
9. E.M. Yimer, K.B. Tuem, A. Karim, N. Ur-Rehman, F. Anwar, *Nigella sativa* L. (Black Cumin): a promising natural remedy for wide range of illnesses. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/1528635>
10. B.H. Ali, G. Blunden, Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother. Res.* **17**, 299–305 (2003). <https://doi.org/10.1002/ptr.1309>

11. M.S.M. Hanafy, M.E. Hatem, Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J. Ethnopharmacol.* **34**, 275–278 (1991). [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90047-H](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90047-H)
12. Z. Gholamnezhad, S. Havakhah, M.H. Boskabady, Preclinical and clinical effects of *Nigella sativa* and its constituent, thymoquinone: a review. *J. Ethnopharmacol.* **190**, 372–386 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.061>
13. M.Y. Hadi, G.J. Mohammed, I.H. Hameed, J., Analysis of bioactive chemical compounds of *Nigella sativa* using gas chromatography-mass spectrometry. *Pharmacogn. Phytother.* **8**, 8–24 (2016). <https://doi.org/10.5897/JPP2015.0364>
14. Ö. Coşkun, B. Çakır, B. Vahapoğlu, İ. Gülseren, Influence of extraction conditions on structural and functional characteristics of black cumin protein concentrates and ACE-inhibition in their hydrolysates. *J. Food Meas. Charact.* **13**, 2328–2338 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00152-1>
15. B. Çakır, İ. Gülseren, Identification of novel proteins from black cumin seed meals based on 2D gel electrophoresis and MALDI-TOF/TOF-MS analysis. *Plant Food Hum. Nutr.* **74**, 414–420 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00751-9>
16. İ. Gülseren, M. Corredig, Storage stability and physical characteristics of tea-polyphenol-bearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. *J. Agr. Food Chem.* **61**, 3242–3251 (2013). <https://doi.org/10.1021/jf3045439>
17. B. Keil, in *The Enzymes*, vol. 3, ed. by P.D. Boyer (Academic Press, Cambridge, 1971), pp. 249–275. [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(08\)60399-6](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(08)60399-6)
18. E.A.F. Mamboya, Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. *Am. J. Biochem. Biotech.* **8**, 99–104 (2012). <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2012.99.104>
19. E.N. Frankel, A.S. Meyer, The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1925–1941 (2000). [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200010\)80:13%3C1925:AID-JSFA714%3E3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200010)80:13%3C1925:AID-JSFA714%3E3.0.CO;2-4)
20. C.M. Liyana-Pathirana, F. Shahidi, C. Alasavar, Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and its concentrated juice. *Food Chem.* **99**, 121–128 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.046>
21. D. Villano, M.S. Fernandez-Pachon, M.L. Moya, A.M. Troncoso, M.C. Garcia-Parrilla, Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* **71**, 230–235 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.050>
22. T.C.P. Dinis, V.M.C. Madeira, L.M. Almeida, Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) assay inhibitors of membrane lipid peroxidation and assay peroxyl radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**, 161–169 (1994). <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1485>
23. M.A. Ebrahimzadeh, S.F. Nabavi, S.M. Nabavi, Antioxidant activities of methanol extract of *Sambucus ebulus* L. flower. *Pak. J. Biol. Sci.* **12**, 447–450 (2009). <https://doi.org/10.3923/pjbs.2009.447.450>
24. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth Enzymol.* **186**, 1–85 (1990). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-B)
25. E.M. Becker, L.S. Nissen, L.H. Skibsted, Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *Eur Food Res Technol.* **219**, 561–571 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1012-4>
26. F. Candan, M. Unlu, B. Tepe, D. Daferera, M. Polissiou, A. Sokmen, H.A. Akpulat, Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* **87**, 215–220 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00149-1)
27. I.C. Sheih, T.J. Fang, T.K. Wu, Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chem.* **115**, 279–284 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.019>
28. S. Gupta, P. Kapoor, K. Chaudhary, A. Gautam, R. Kumar, G.P.S. Raghava, *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLoS ONE* **8**, e73957 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>
29. C. Mooney, N.J. Haslam, G. Pollastri, D.C. Shields, Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity. *PLoS ONE* **7**, e45012 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045012>
30. L.G. Trabuco, S. Lise, E. Petsalaki, R.B. Russell, PepSite: prediction of peptide-binding sites from protein surfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**, W423–W427 (2012). <https://doi.org/10.1093/nar/gks398>
31. P. Zhou, B. Jin, H. Li, S.Y. Huang, HPEPDOCK: a web server for blind peptide–protein docking based on a hierarchical algorithm. *Nucleic Acids Res.* **46**, W443–W450 (2018). <https://doi.org/10.1093/nar/gky357>
32. F. Cheng, W. Li, Y. Zhou, J. Shen, Z. Wu, G. Liu, P.W. Lee, Y. Tang, admetSAR: a comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 3099–3105 (2012). <https://doi.org/10.1021/ci300367a>
33. S.A. Malomo, R.E. Aluko, *In vitro* acetylcholinesterase-inhibitory properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **93**, 411–420 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2779-0>
34. H. Zare-Zardini, B. Tolueinia, A. Hashemi, L. Ebrahimi, F. Fesahat, Antioxidant and cholinesterase inhibitory activity of a new peptide from *Zizyphus jujuba* fruits. *Am.J. Alzheimers Dis.* **28**, 702–709 (2013). <https://doi.org/10.1177/1533317513500839>
35. A. Kannan, N.S. Hettiarachchy, M. Mahedevan, Peptides derived from rice bran protect cells from obesity and Alzheimer's disease. *Int J Biomed Res* **3**, 131–135 (2012). <https://doi.org/10.7439/ijbr.v3i3.299>
36. F. Daneshmand, H. Zare-Zardini, L. Ebrahimi, Investigation of the antimicrobial activities of Snakin-Z, a new cationic peptide derived from *Zizyphus jujuba* fruits. *Nat. Prod. Res.* **27**, 2292–2296 (2013). <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.827192>
37. C.B. Ahn, K.H. Lee, J.Y. Je, Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: effects of enzymes and molecular weight on bioactivity. *Int J Food Sci Tech* **45**, 562–568 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02166.x>
38. S.A. Malomo, R.E. Aluko, Kinetics of acetylcholinesterase inhibition by hemp seed protein-derived peptides. *J Food Biochem* **43**, e12897 (2019). <https://doi.org/10.1111/jfbc.12897>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Affiliations

İnci Zent¹ · Ayşe Gülden Göksu¹ · Bilal Çakır^{2,3} · İbrahim Gülseren^{1,4} 

✉ İbrahim Gülseren
ibrahim.gulseren@izu.edu.tr

¹ Department of Food Engineering, İstanbul S. Zaim University (İZÜ), Halkalı – Küçükçekmece, İstanbul, Turkey

² İstanbul S. Zaim University (İZÜ), Halal Food R&D Center, Halkalı, Küçükçekmece, İstanbul, Turkey

³ Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Marmara University, Institute of Health Sciences, Maltepe, İstanbul, Turkey

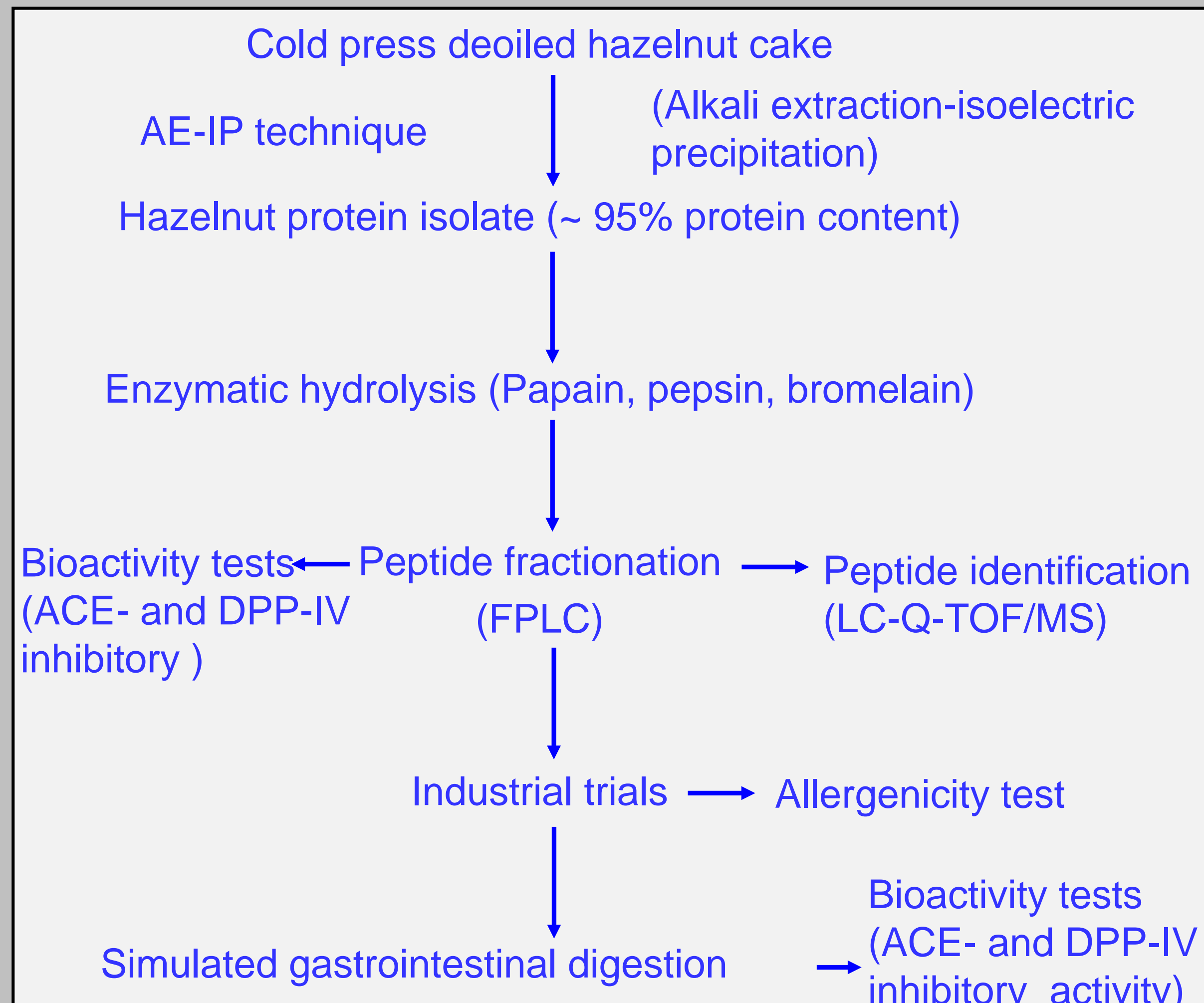
⁴ İZÜ Food and Agricultural Research Center (GTÜAM), Halkalı Campus, Küçükçekmece, 34303 İstanbul, Turkey

EK-4

ABSTRACT

Manufacture of cold press seed oils generates extensive amounts of seed cakes that can be valorized towards the production of plant proteins and related products. In the current study, cold press deoiled hazelnut cakes were utilized in the production of protein isolates based on a simple alkali extraction-isoelectric precipitation (AE-IP) technique. Enzymatic hydrolysis of the isolates was performed using papain, bromelain and pepsin. Thus generated hazelnut protein hydrolysates were subjected to anion exchange chromatography based fractionation using an FPLC setup. The fractions were analyzed for their ACE-inhibitory activities. The fractions with the highest ACE-inhibitory characteristics were then analyzed by an appropriate LC-Q-TOF/MS technique to identify the potentially bioactive (i.e., ACE-inhibitory) peptide sequences. Finally, bioactive hazelnut peptide fractions (0-2% by wt) were utilized in the manufacture of hazelnut paste and spread products in industrial settings based on the protocols of a major local company (FISKOBIRLIK, Giresun, Turkey) and these products were subjected to allergenicity analysis. The protein content of the isolates was approx. 94.5% as determined by Dumas analysis. Sensory and microbiological characteristics of the finished products were comparable to that of the control samples. In most cases, a significant reduction in hazelnut protein allergenicity was observed in the bioactive fraction bearing products. Using LC-Q-TOF/MS, 95 distinctly different peptide sequences were determined and for some of these peptides, ACE-inhibitory characteristics were also verified *in silico*. Long-term storage and simulated gastrointestinal digestion studies are being currently carried out to characterize the stability of peptide fractions and their corresponding activities in the finished food products. Based on our past and current work, hazelnut peptides have been shown to possess significant ACE- and DPP-IV inhibitory and antioxidative characteristics. Consequently, hazelnut cakes or meals have the potential to serve as a rational resource for the manufacture of bioactive peptides.

METHODOLOGY



Raw Materials and Enzymatic Processing

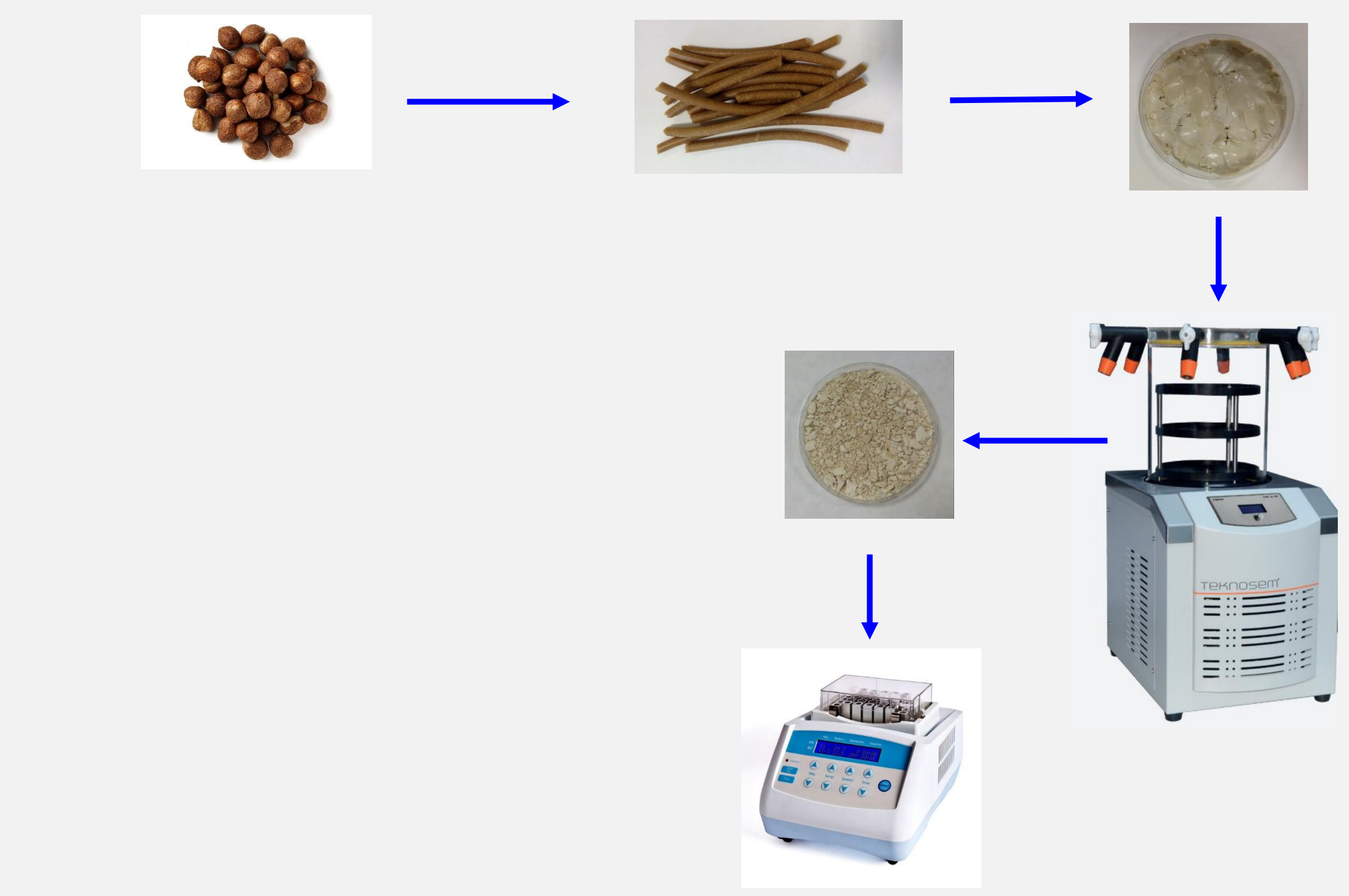


Figure 1. Preparation of hydrolysates of protein concentrates

- Cold press deoiled hazelnut cakes were donated by a local company.
- Protein concentrates were obtained from deoiled cakes using an AE-IP technique.
- Proteolytic hydrolysis was performed using papain, bromelain and pepsin (i.e., 3 different proteases).

PEPTIDE FRACTIONATION (FPLC)

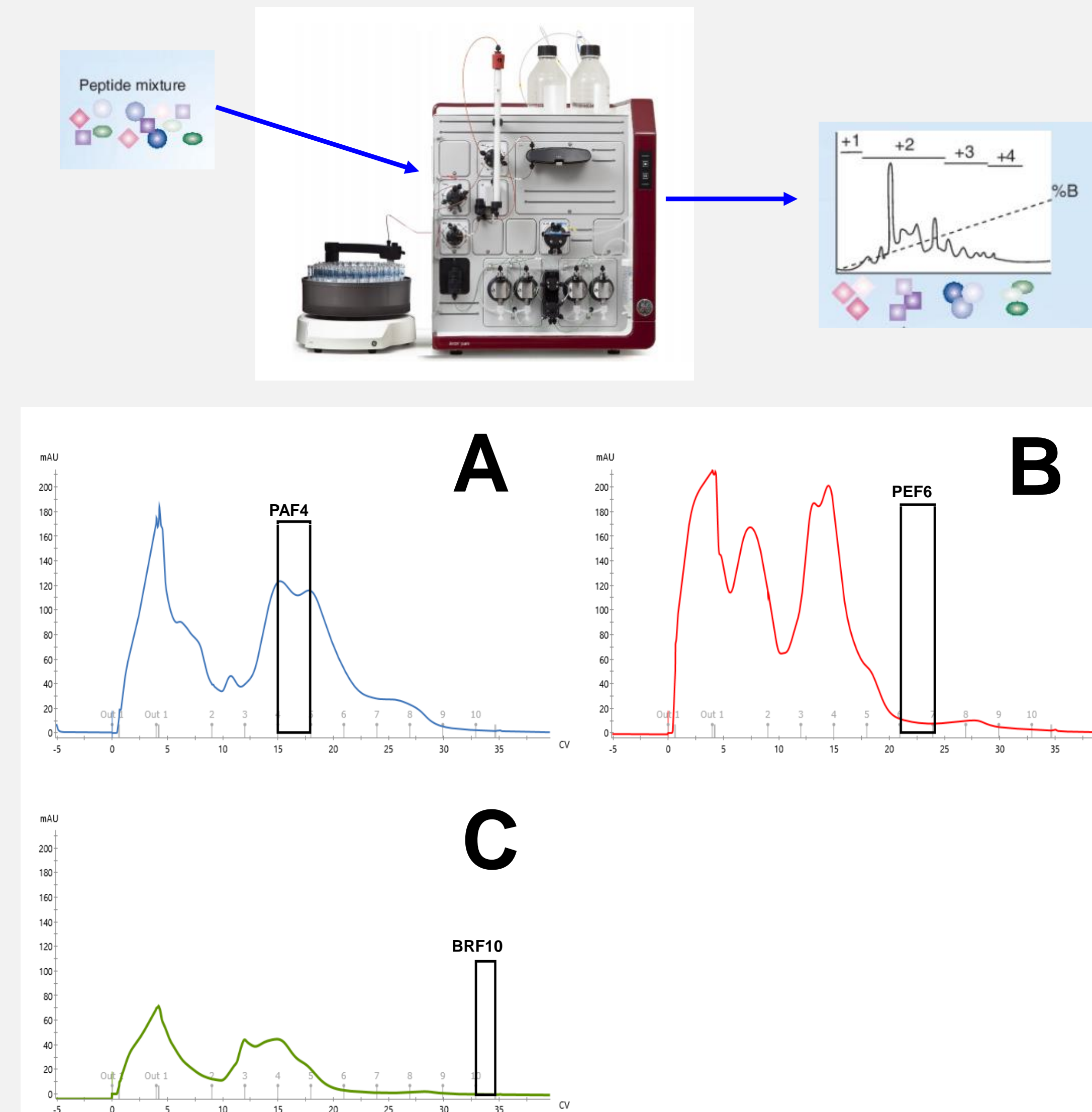


Figure 2. FPLC Chromatograms of the enzymatic hydrolysates (A: Papain, B: Pepsin, C: Bromelain).

- The hazelnut protein hydrolysates were subjected to ion exchange chromatography based fractionation.
- The fractions were analyzed for their bioactive attributes.

BIOACTIVITY TESTS

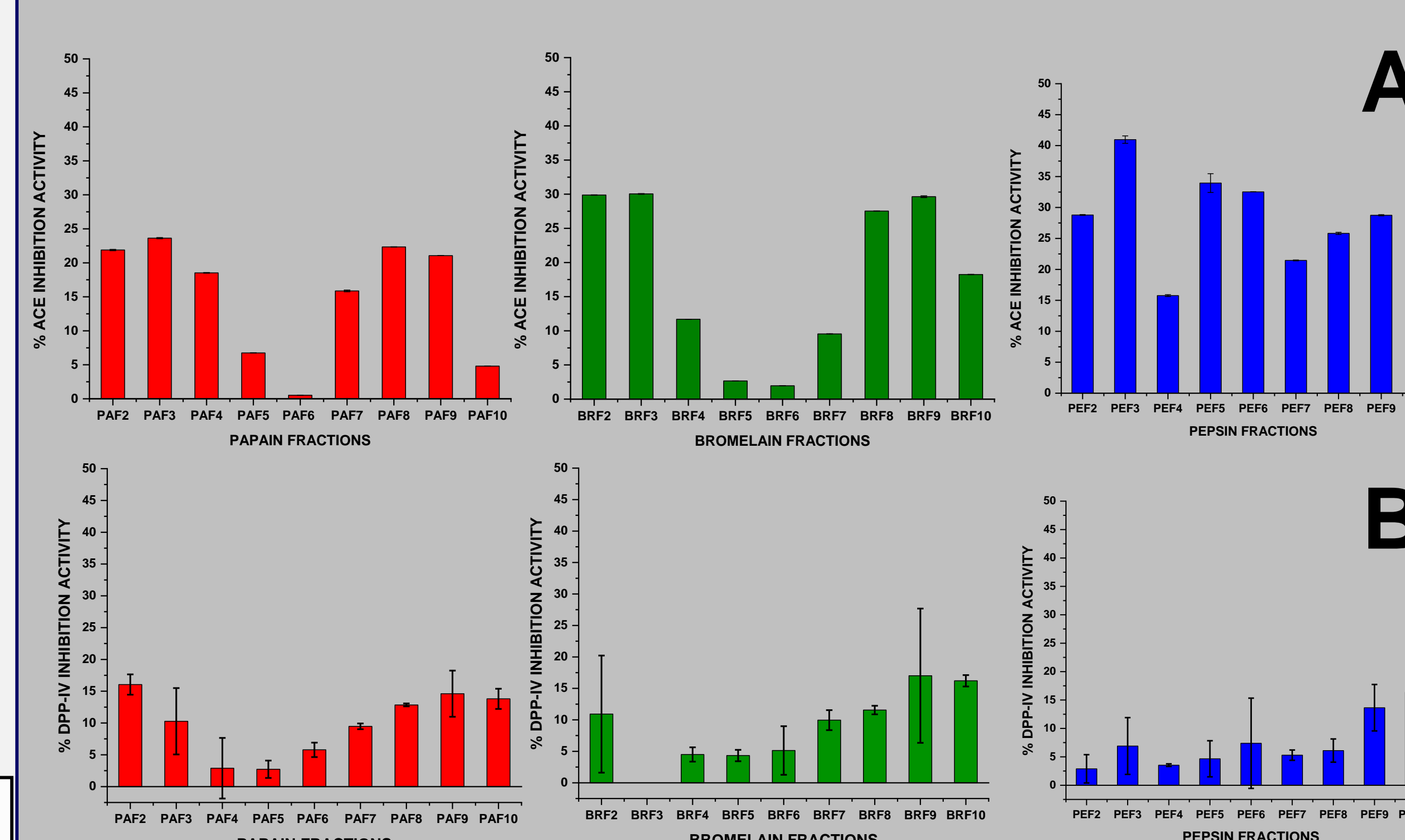


Figure 3. % ACE (A) and % DPP-IV inhibitory activity (B) of fractions.

- The hydrolysates demonstrated various extents of ACE- and/or DPP-IV inhibitory activities.
- The results were enzyme-specific.
- 95 different peptides were identified in bioactive fraction via LC-Q-TOF/MS. For some of them, bioactivity was verified *in silico*.
- Most intensely bioactive fractions were utilized in industrial trials.

INDUSTRIAL TRIALS (FLOWCHART)

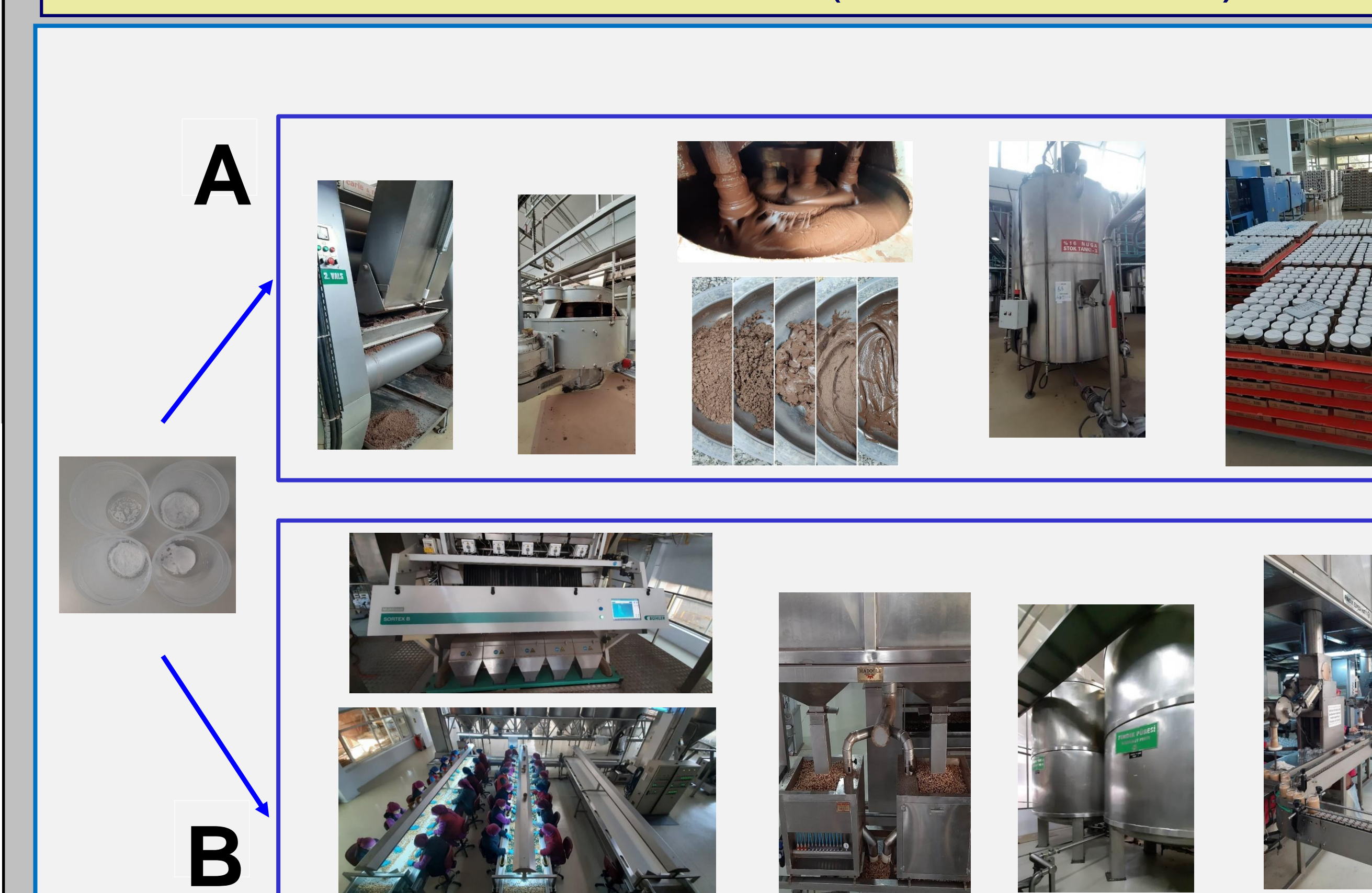


Figure 4. Inclusion in industrial food applications (A: Hazelnut spread, B: Hazelnut paste)

- Bioactive fractions of the hazelnut protein hydrolysates were included in cocoa hazelnut spread and hazelnut paste products.
- The formulations and processing flowchart was based on the internal procedures of the supporting company (FISKOBIRLIK, Turkey) with minor modifications as necessary.

SIMULATED DIGESTION & ALLERGY REDUCTION

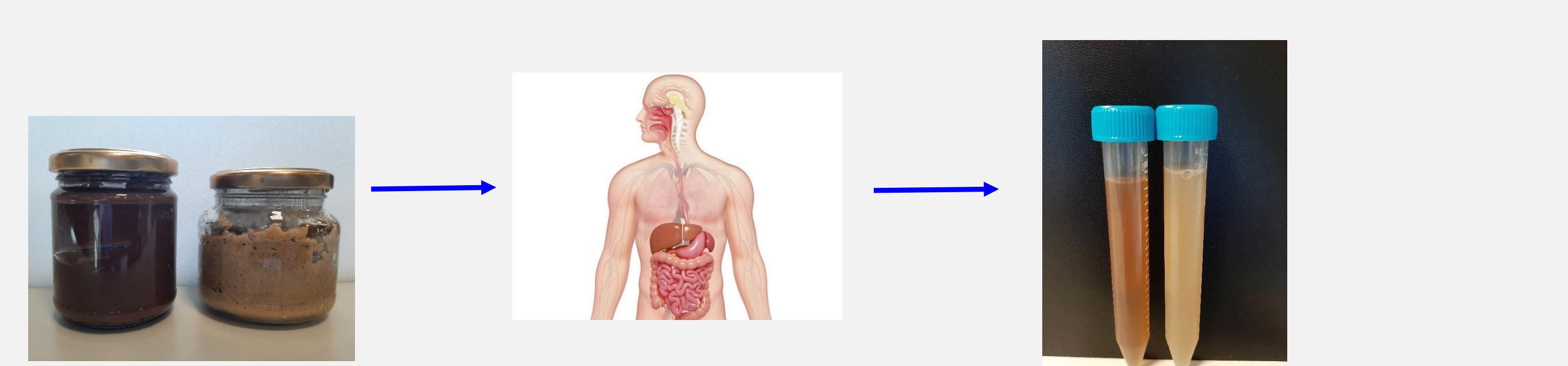


Figure 5. Simulated *in vitro* digestion of fractions in bioactive peptide bearing hazelnut paste and spread products.

The simulated *in vitro* digestion process consisted of three stages: Simulated oral, gastric and intestinal digestion.

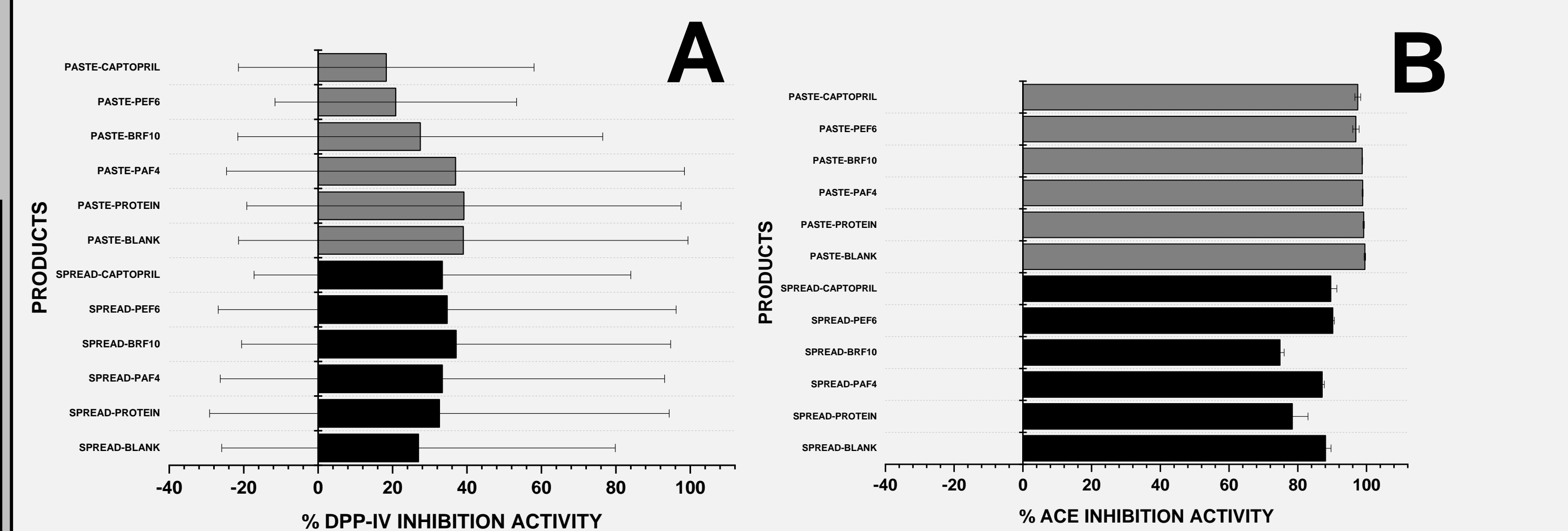


Figure 6. % DPP-IV (A) and % ACE inhibitory activity (B) of bioactive peptide bearing digested products after simulated *in vitro* digestion.

- Fractions obtained with papain, bromelain, or pepsin were also examined to determine the effect of hydrolysis on allergenicity of hazelnut proteins.
- The antigenicity showed a significant decrease in some of the finished products.
- Enzymatic hydrolysis of hazelnut proteins and fractionation of hydrolysates significantly altered their antigenicity.

CONCLUSIONS

- DPP-IV and ACE-inhibitory activities of all fractions were determined.
- The fractions with the highest bioactivities were then analyzed by LC-Q-TOF/MS to identify the peptide sequences present in them (95 different peptides were identified). Some of them were bioactive *in silico*.
- Some of the bioactivity was preserved after industrial processing and simulated digestion, while significant reduction took place in allergenic characteristics.
- Visual characteristics of the bioactive peptide bearing products were comparable to conventional counterparts.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by a grant from The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK, Grant No. 2170063). We also would like to thank FISKOBIRLIK (Giresun, Turkey) for their support in industrial trials.

İbrahim GÜLSEREN

Kimden: NZBP2020 <Content-NZBP2020@elsevier.com>
Gönderme Tarihi: 1 Eylül 2020 Salı 19:24
Kime: İbrahim GÜLSEREN
Konu: NIZO Plant Protein Functionality Conference - Young Scientist Award

NIZO Plant Protein Functionality Conference Online – Live and On-demand | 21-22 October 2020

Abstract reference number: **NZBP2020_0078** (Please quote in all correspondence)

Dear **İbrahim Gülseren**,

Congratulations on being selected to present your **Poster** at **NIZO Plant Protein Functionality Conference Online – Live and On-demand** on **21-22 October 2020**.

The Scientific Committee of the conference invites applicants for a **Young Scientist Award**. If you are a young scientist (student, PhD student or equivalent), please respond to this email and confirm your eligibility. Six successful applicants will be invited to make a short 5-minute oral presentation during the oral programme.

Looking forward to your response.

Kind Regards
Judy

Judy Raj
Conference Content Executive
Content-NZBP2020@elsevier.com

**NIZO**
FOR BETTER FOOD & HEALTH

NIZO Plant Protein Functionality Conference

Online – Live and On-demand • 21–22 October 2020



AMEND

CONTINUE

NIZO Plant Protein Functionality Conference-Online – Live and On-demand

Submission ID

78

Title

Valorization of bioactive hazelnut peptides in industrially processed hazelnut paste and spread products

Abstract

Manufacture of cold press seed oils generates extensive amounts of seed cakes that can be valorized towards the production of plant proteins and related products. In the current study, cold press deoiled hazelnut cakes were utilized in the production of protein isolates based on a simple alkali extraction-isoelectric precipitation (AE-IP) technique. Enzymatic hydrolysis of the isolates was performed using papain, bromelain and pepsin. Thus generated hazelnut protein hydrolysates were subjected to anion exchange chromatography based fractionation using an FPLC setup. The fractions were analyzed for their ACE-inhibitory activities. The fractions with the highest ACE-inhibitory characteristics were then analyzed by an appropriate LC-Q-TOF/MS technique to identify the potentially bioactive (i.e., ACE-inhibitory) peptide sequences. Finally, bioactive hazelnut peptide fractions (0-2% by wt) were utilized in the manufacture of hazelnut paste and spread products in industrial settings based on the protocols of a major local company (FISKOBIRLIK, Giresun, Turkey) and these products were subjected to allergenicity analysis. The protein content of the isolates was approx. 94.5% as determined by Dumas analysis. Sensory and microbiological characteristics of the finished products were comparable to that of the control samples. In most cases, a significant reduction in hazelnut protein allergenicity was observed in the bioactive fraction bearing products. Using LC-Q-TOF/MS, 95 distinctly different peptide sequences were determined and for some of these peptides, ACE-inhibitory characteristics were also verified *in silico*. Long-term storage and simulated gastrointestinal digestion studies are being currently carried out to characterize the stability of peptide fractions and their corresponding activities in the finished food products. Based on our past and current work, hazelnut peptides have been shown to possess significant ACE- and DPP-IV inhibitory and antioxidative characteristics. Consequently, hazelnut cakes or meals have the potential to serve as a rational resource for the manufacture of bioactive peptides.

App

Yes



I confirm that this submission has been approved by all authors

Copyright

I confirm that I have copyright permission to use any images included within this submission, including the abstract and any subsequent paper, poster or presentation.

Authors and Affiliations

Ayşe Gülden Göksu

Istanbul S. Zaim University (IZU), Turkey

Bilal Çakır

Istanbul S. Zaim University (IZU), Turkey

İbrahim Gülseren (Presenting)

Istanbul S. Zaim University (IZU), Turkey

Presenter Email

ibrahim.gulseren@izu.edu.tr

Presenter gender

- Woman
- Man
- Other/Non-binary
- Prefer Not to Disclose

Categories

Other

Other category

Sustainability along the chain of plant protein ingredients and application in foods

Keywords

Hazelnut proteins, Bioactive peptides, Functional foods, ACE-inhibitory activity



AV requirements

- Video
- Computer projection
- Mac used

Author will attend

- I confirm that at least one author will register in full to attend and present the paper at the Conference

powered by **OXFORD** ABSTRACTS

EK-5

No	Fraction	Sequence	Modifications
	PAF-		
1	OUT	ADIYTEQVGR	
	PAF-		
2	OUT	AESEGFVWVAFK	
	PAF 4 &		
3	5	AISDMPESTGTTATTATMPHGGSDLR	
4	BR-OUT	CIRKSWVVRQLVK	[1] Carbamidomethyl C
5	BRF-5	CPETFEDPQQQSQQG	[1] Carbamidomethyl C [1] Carbamidomethyl C
6	BR-OUT	CRDERQFDEQQRRDG	[1] Carbamidomethyl C [10] Deamidation Q
7	PAF2	DENEKLFIVK	
8	PAF 3	DFDEPGHLAPT	
9	BR-Out	DSDWLRVATEQA	[N-term] Acetyl N-TERM
10	BR-OUT	DSPVVAVSLLHTNNY	
11	PAF 6	DTDILAAFRVTPQPGVPPEEAGAAVAESSTGTWTTVWTDGLTSLDR	
12	BR-OUT	DWWNAK	
13	BR-F??	EDRRTDFA	
14	BR-OUT	ELLRFGDREFY	
15	PAF2	ESFNVEHGDIIIR	
16	PAF 3	ESPLSSDAIFR	
17	BR-OUT	ESSGPINLLHK	
18	PEF-2	FAVAKRAESEGF	
19	PEF-2	FEDPQQQSQQGQGGQGSQRSEQDRHQKIRY	[12] Deamidation Q
20	PEF-2	FEDPQQQSQQGQGGQGSQRSEQDRHQKIRY	[10] Deamidation Q
21	PEF-2	FEDPQQQSQQGQGGQGSQRSEQDRHQKIRY	[18] Deamidation Q
22	PEF-2	FEDPQQQSQQGQGGQGSQRSEQDRHQKIRY	[26] Deamidation Q
23	PEF-2	FEDPQQQSQQGQGGQGSQRSEQDRHQKIRY	[5] Deamidation Q
24	PEF-2	FEDPQQQSQQGQRQGQGSQRSEQDRHQKIRHFREGDIIA	[7] Deamidation Q [6] Carbamidomethyl C [C-term] Dehydrated
25	PEF-4	FEETICS	
26	BR-OUT	FEWVAFK	
27	BR-OUT	FFFPGPNK	
	PEF6 &		
28	PE-2	FGGGTLGHP	
	PEF3 -		
29	PE-2	FMRWRDRFL	
30	BR-OUT	FPCLRNGIPK	[3] Carbamidomethyl C
31	BR-OUT	FQISREEARRLK	
32	BR-Out	FQRFTRPDEKQPA	
	PEF2 -		
33	PE-2	FTANTSLAH	[N-term] Acetyl N-TERM [3] Deamidation N
34	BR-OUT	ILNSLI	

35	BR-OUT PAF-	ILNSLIS	[N-term] Acetyl N- TERM [3] Deamidation N
36	OUT PAF-	INTVNSNTLPVLR	[5] Deamidation N
37	OUT PAF-	INTVNSNTLPVLR	
38	OUT	INTVNSNTLPVLR	[2] Deamidation N
39	PA- Out BR-OUT	IQVNKENKEFK	
40	& BRF-2	IRALPDDVLA	
41	PEF-2	LDENPRHF	
42	BRF-2	LEPTNRIEA	
43	PAF 3	LGDYLLEQGL	[9] Carbamidomethyl C [17] Carbamidomethyl C
44	BR-OUT	LILVSFSLCLLVLFNGCLG	
45	PEF-2	LNAHSVV	
46	BR-OUT	LPDDVLANA	[8] Deamidation N [2] Deamidation Q [7] Deamidation N
47	BR-OUT	LQNKFRNSMVG	[11] Carbamidomethyl C
48	BR-OUT	LSVPNLYVWLCMFY	
49	BR-OUT	LYVPHWNLNA	
50	BRF-2	LYVPHWNLNA	[7] Deamidation N
51	BR-F??	MAISDMPESTG	
52	PA-2	MGPTFGAMMISGQK	
53	BR-OUT	MINRDENEKLFIVK	
54	BR-OUT	MINRDENEKLFIVK	[1] Oxidation M
55	PEF4	MSPQTETKASVG	
56	PE-2	MSPQTETKASVG	
57	BR-OUT	NAFQISREEA	
58	BR-OUT PAF-	NAFQISREEA	[1] Deamidation N
59	OUT	NKTTDVAQSAK	
60	BRF-2 BR-OUT	NNVFSGFDA	
61	& BRF-2	NQLDENPRHFY	
62	BR-Out	NSHVREVRGVG	[N-term] Acetyl N- TERM [1] Deamidation N [14] Carbamidomethyl C [20] Oxidation M [21] Carbamidomethyl C
63	PAF 3	NSMVGNMIFWFFFCILGQPMCVLLYYHDLNMR	[14] Carbamidomethyl C [21] Carbamidomethyl C [30] Oxidation M
64	PAF 4	NSMVGNMIFWFFFCILGQPMCVLLYYHDLNMR	

65	BR-OUT	NSRFPLAG	
66	BR-OUT	NSVRESVRVRDSSTDESLA	
67	BR-Out	NVEVQAPSSVK	[N-term] Acetyl N-TERM
	PAF-		
68	OUT	QGQQQFGQR	
69	BRF-5	QIESWDHNDQQFQCAG	[14] Carbamidomethyl C
70	BR-OUT	QQQFGQRRRQQHSG	
71	BR-OUT	QVLTIPQNFA	
72	BR-OUT	QVLTIPQNFAVA	
			[N-term] Acetyl N-TERM [5] Deamidation Q
73	BR-OUT	RARVQVDDNG	
	PAF-		
74	OUT	RLQSNQDK	[N-term] Acetyl N-TERM
75	BR-OUT	RVQVLENFTK	
76	BR-OUT	RVQVDDNGNTVFDDELQ	
	PAF-		
77	OUT	SEGFVWVAFK	
	PEF5 &		
78	PE-2	SPQTETKASVG	
79	PA- Out	STSKDAQALIQSLR	
80	BR-OUT	TEEGRVQVLENFTK	
81	BR-Out	TLLVFDEVQCG	[10] Carbamidomethyl C
82	BR-Out	TLLVFDEVQCGLG	[10] Carbamidomethyl C
83	BR-Out	TLTHVSNVY	
84	BR-OUT	TNDNAQISPLA	
	PAF-		
85	OUT	TVDATQSTK	
86	BR-OUT	VFQDEHFESRVKTEEG	
87	BR-OUT	VIRRTIEPNGLLPQY	
88	BR-OUT	VIRRTIEPNGLLPQY	[9] Deamidation N
89	BR-OUT	VPHWNLNA	
90	BR-OUT	VSLHTNNYA	
			[2] Oxidation M [10] Carbamidomethyl C
91	BR-OUT	WMVRHIYFCLRNG	
92	PEF-2	WNLNAHSV	
93	PEF-4	YNDGDSPVAVS	
94	PA-2	YNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIK	[20] Deamidation N
95	PE-3	YVKDRVDEVDHTN	

EK-6

MUAYENE ANALİZ RAPORU

Rapor No : LTS.A.2020.11464
Rapor Tarihi : 24 TEMMUZ 2020
Analizin Amacı : Ar-Ge
Numuneyi Gönderen Kuruluş/Şahıs : BİLAL ÇAKIR
Adres : İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi
Üretici Firma Adı :
Laboratuvara Geldiği Tarih ve Saat : 14.07.2020 / 13:23
Analizin Başlama ve Bitiş Tarihi : 20.07.2020 - 23.07.2020
Teklif / Talep Numarası : LTS-TKL-2020-344
Numunenin;
Adı : 2-Ezme % 1 Fındık Proteini
Numune Kabul Sıcaklığı : 6 C°
Ticari Markası :
Miktarı (Net) : 100 g /
Cinsi : Ezme
Ambalajı : Steril Numune Kabı
Alındığı Yer : ATN -
Alındığı Tarih/Saat : 14.07.2020 13:23
Üretim / Son Kullanma Tarihi : /
Seri Parti No : -
Numuneyi Alan Personel :

YAPILAN ANALİZLER	ANALİZ SONUÇLARI	DEĞERLENDİRME (**)	ÖLÇÜM LİMİTİ	ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ	GERİ KAZANIM (%)	METOT
1- Fındık Alerjeni (mg/kg)	77,6	DY	-	-	-	Elisa Ridascreen Hazelnut Kit Manuel

Yapılan muayene ve analiz sonucunda yukarıda belirtilen değerler tespit edilmiştir.

ATN: Adresinden teslim alınan numune.
LTE: Laboratuvara teslim edilen numune.

Not: 1- Bu analiz raporunun hiç bir bölümü tek başına veya ayrı ayrı kullanılamaz ve kısmen çoğaltılamaz.
2- Bu analiz raporu adli-idari işlemlerde ve reklam amacıyla kullanılamaz.
3- Analiz sonuçları yukarıda belirtilen numune için geçerlidir.
4- * işaretli metodlar akreditasyon kapsamındadır.
5- $k=2$ %95 Güven Aralığı
6- Talep doğrultusunda geri alma ve ölçüm belirsizliği değeri verilmektedir.
7- Islak imzasız raporlar geçerli değildir.
8- DY: Değerlendirme Yapılmadı.

Ayşenur ÖZDEMİR
Yüksek Biyolog
GDO Analiz Birim Sorumlusu

Ayten SARIKAYA
Kimya Teknikeri
Numune Kabul ve Rapor
Düzenleme Birim Sorumlusu

TASDİK OLUNUR
24 TEMMUZ 2020

Aydan ÖZCAN BAŞTÜRK
Kimyager
Laboratuvar Müdürü

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. İBRAHİM GÜLSEREN
Proje No:	217O063
Proje Başlığı:	Türk Fındığı Küspesinin Fonksiyonel Gıdalarda Kullanılmasının İncelenmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM Ü. MÜHENDİSLİK VE DOĞA BİLİMLERİ F. GIDA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2018 - 15/04/2020
Onaylanan Bütçe:	399130.0
Harcanan Bütçe:	367715.15
Öz:	<p>Bu projede, soğuk pres yöntemi ile yağı alınmış fındık posasından biyoaktif özellikleri bulunan ve alerjenik özellikleri kısmen ya da tamamen baskılanmış protein hidrolizatları üretilmesi amaçlanmıştır. Biyoaktif özellikleri doğrulanan peptid fraksiyonları ulusal bir firmamızın (FİSKOBİRLİK) desteği ile endüstriyel fındık ürünleri üretiminde değerlendirilmiş ve bu peptitlerin varlığında ürünlerin biyoaktif özellikleri incelenmiştir.</p> <p>Öncelikle uygun sulu ekstraksiyon (alkali çözündürme ve izoelektrik çökeltme) teknikleri ile protein izolatları üretilmiş (%90'dan fazla protein), sonraki aşamalarda 6 farklı proteaz (pepsin, tripsin, kimotripsin, termolizin, bromelain ve papain) kullanılarak enzimatik hidroliz ile bu fındık proteinlerinin parçalanması sağlanmış ve hidrolizatlarda bulunan peptitler biyoaktif özellikler açısından (antihipertansif, antioksidatif ve antidiyabetik özellikler) değerlendirilmiştir. Bu amaçla elde edilen protein hidrolizatları uygun FPLC yöntemleri (anyon değişimi) ile fraksiyonlara ayrılmıştır. Bu fraksiyonlardan biyoaktif özellikleri bulguların öncelikle LC-Q-TOF/MS yöntemleri ile dizilimler belirlenmiş ve uygun in silico yöntemler ile de biyoaktif özellikleri doğrulanmıştır. En etkin biyoaktif özellikleri olan hidrolizat fraksiyonları ulusal bir firmamızın (FİSKOBİRLİK) desteği ile fındık ürünleri üretiminde değerlendirilmiştir. Burada temel hedef, alerjenik özellikleri baskılanmış ve biyoaktif özellikleri korunmuş katma değerli, endüstriyel fındık ürünleri üretilmesidir. Endüstriyel koşullarda üretilen fındık ürünleri (fındık ezmesi ve kakaolu fındık kreması) yürütücü kuruluş laboratuvarlarında simüle edilmiş gastrointestinal sindirime tabi tutulmuştur. Sindirilen fraksiyonlar da yeniden biyoaktif özellikler açısından (özellikle in vitro antihipertansif aktivite) değerlendirilmiştir. Sindirim aşamasından sonra da peptid profili uygun HPLC teknikleri ile analiz edilmiştir.</p> <p>Bu çalışmalara bağlı olarak öncelikle aktif olma potansiyeli bulunan yüzlerce peptid dizilimi belirlenmiştir. Bu peptitlerin bulunduğu fraksiyonların antihipertansif, antioksidatif ve antidiyabetik özellikleri değerlendirilmiş ve en etkili fraksiyonların bazıları endüstriyel denemelerde kullanılmıştır. Bu çalışmalara bağlı olarak fındık peptitlerinin biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesi yanında biyoaktif fındık peptitlerini içeren fraksiyonların gıda ürünlerinde kullanımı, katıldıkları ürünlerde peptitlerin stabilitesi ve sindirim sürecinde aktivitenin korunması ile ilgili değerlendirmelerde bulunulmuştur.</p>
Anahtar Kelimeler:	Fındık, biyoaktif peptitler, enzimatik hidroliz, antihipertansif aktivite, fındık ezmesi.
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- PRELIMINARY INVESTIGATIONS IN VITRO ACE-INHIBITORY ACTIVITIES OF TRYPTIC PEPTIDES PRODUCED FROM COLD PRESS DEOILED HAZELNUT MEALS (Makale - Diğer Hakemli Makale),