

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

**NOHUT PROTEİN HİDROLİZATLARININ
ANJİYOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM (ADE)
İNHİBİTÖR AKTİVİTESİ ÜZERİNE ULTRASON,
MİKRODALGA, FERMANTASYON VE PİŞİRMENİN
ETKİLERİ**

**Hazırlayan
Fadime Begüm OTAĞ**

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet HAYTA**

Yüksek Lisans Tezi

**Kasım 2014
KAYSERİ**

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

**NOHUT PROTEİN HİDROLİZATLARININ
ANJİYOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM (ADE)
İNHİBİTÖR AKTİVİTESİ ÜZERİNE ULTRASON,
MİKRODALGA, FERMANTASYON VE PİŞİRMENİN
ETKİLERİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Fadime Begüm OTAĞ**

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet HAYTA**

**Bu Çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından FYL-2013-4273 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Kasım 2014
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Fadime Begüm OTAĞ



YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Nohut Protein Hidolizatlarının Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) İnhibitör Aktivitesi Üzerine Ultrason, Mikrodalga, Fermantasyon ve Pişirmenin Etkileri” adlı Yüksek Lisans, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Fadime Begüm OTAĞ



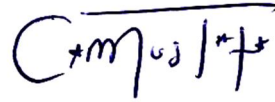
Danışman

Prof. Dr. Mehmet HAYTA



Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Mahmut DÖĞAN V.



Prof. Dr. Mehmet HAYTA danışmanlığında **Fadime Begüm OTAĞ** tarafından hazırlanan “**Nohut Protein Hidrolizatlarının Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) İnhibitör Aktivitesi Üzerine Ultrason, Mikrodalga, Fermantasyon ve Pişirmenin Etkileri**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

09/10/2014

JÜRİ:

Başkan: Prof. Dr. Mehmet HAYTA

Üye : Prof Dr. Mahmut DOĞAN

Üye : Doç. Dr. Hasan YALÇIN

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun 11.11.2014 tarih ve 2014/51-20 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Kâzım Keşlioğlu

NOHUT PROTEİN HİDROLİZATLARININ ANJİYOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM (ADE) İNHİBİTÖR AKTİVİTESİ ÜZERİNE ULTRASON, MİKRODALGA, FERMANTASYON VE PİŞİRMENİN ETKİLERİ

Fadime Begüm OTAĞ
Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Kasım 2014
Danışman: Prof. Dr. Mehmet HAYTA

ÖZET

Bu çalışmada nohuttan elde edilen protein izolatlarındaki ADE inhibisyon ve antioksidan aktivitesi ölçülmüştür. Nohutlara pişirme, mikrodalga, ultrason, fermantasyon gibi ön işlemler uygulandıktan sonra aktivitedeki değişiklik araştırılmıştır. Bütün örnekler pepsin ve tripsin ile hidroliz edildikten sonra analiz edilmiştir. En yüksek ADE inhibisyon aktivitesi ultrason uygulanan örneklerde görülmüştür. Aktivite ham nohuta göre yaklaşık %21,0-40,7 oranında artmıştır. Fermantasyon ve kaynatma ön işlemleri sonucu aktivitede azalma gözlenmiştir. DPPH radikali süpürücü aktivite en fazla fermantasyon uygulanan örneklerde görülmüştür. Sonra sırasıyla pişirme ve mikrodalga uygulanan örnekler gelmektedir. Çalışma sonunda ultrason uygulamasının ADE inhibisyon aktiviteyi artırmada faydalı olduğu, fermantasyonun ise antioksidan aktiviteyi artırdığı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Nohut, ADE inhibisyonu, DPPH, antioksidan, biyoaktif peptitler, ultrason, mikrodalga, fermantasyon, pişirme

**EFFECTS OF ULTRASOUND, MICROWAVE, FERMENTATION AND HEAT
TREATMENTS ON ANGIOTENSIN-I CONVERTING ENZYME ACTIVITY
OF CHICKPEA BIOACTIVE PEPTIDES**

Fadime Begüm OTAĞ

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M.Sc. Thesis, November 2014

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet HAYTA

ABSTRACT

In this study, ACE inhibitory and antioxidant activity of chickpea protein isolates were measured. After applying pre-treatments such as cooking, microwave, ultrasound and fermentataion, changes in activity were investigated. All samples were analyzed after hydrolysis with pepsin and trypsin. The highest ACE inhibitory activity was observed in the ultrasound applied samples. The ACE activity increased about 21,0- 40.7% when compared to the raw chickpe samples. Pre-treatment such as fermentation and cooking resulted in a decrease in ACE activity. Fermentantion was found as the most effective pre-treatment for the increased DPPH-radical scavenging activity. Cooking and microwave pre-treatments also increased the antioxidant activity. As a result of present study, it was demonstrated that ultrasound treatment is useful process for the increasing ACE inhibitory activity whereas fermentation was effective on antioxidant activity.

Key words: Chickpea, ACE inhibition, DPPH, antioxidant, bioactive peptides, ultrasound, microwave, fermentation, cooking

İÇİNDEKİLER

NOHUT PROTEİN HİDROLİZATLARININ ANJİYOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM (ADE) İNHİBİTÖR AKTİVİTESİ ÜZERİNE ULTRASON, MİKRODALGA, FERMANTASYON VE PİŞİRMENİN ETKİLERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
KABUL ONAY	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Fonksiyonel Gıdalar.....	3
1.2. Biyoaktif Peptitler	3
1.2.1. Opioid peptitler.....	4
1.2.2. Antitrombotik peptitler	4
1.2.3. Mineral bağlayan peptitler	5
1.2.4. Antimikrobiyel peptitler	5
1.2.5. Hipokolesterolemik peptitler	6
1.2.6. Sitomodülatör peptitler.....	6
1.2.7. Bağışıklık sistemini düzenleyici (immunomodülatör) peptitler	6
1.2.8. Antioksidan peptitler	7
1.2.9. Antihipertansif peptitler	9
1.2.9.1. Hipertansiyon.....	9

1.2.9.2. Renin-anjiyotensin sistem (Şekil 1)	10
1.2.9.3. ADE inhibitörü peptitler	11
1.2.9.3.1. Süt kaynaklı ADE inhibitörü peptitler	14
1.2.9.3.2. Et kaynaklı ADE inhibitörü peptitler	16
1.2.9.3.3. Baklagil kaynaklı ADE inhibitörü peptitler	16

2. BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal	18
2.2. Metot	18
2.2.1. Öğütme	18
2.2.2. Nohut protein izolatu eldesi	18
2.2.3. Fermantasyon	19
2.2.4. Pişirme	19
2.2.5. Ultrason uygulaması	19
2.2.6. Mikrodalga uygulaması	19
2.2.7. Protein hidrolizi	19
2.2.8. Protein miktarının belirlenmesi	20
2.2.9. ADE inhibisyon aktivitesi	21
2.2.10. DPPH radikal süpürme aktivitesi	21
2.2.11. İstatistik Analiz	22

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Protein Miktarı	23
3.2. ADE inhibitör aktivitesi	24
3.3. DPPH radikali süpürme aktivitesi	25

4. BÖLÜM

TARTIŞMA

5. BÖLÜM

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

KAYNAKLAR	34
ÖZ GEÇMİŞ.....	45

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Gıdalarda bulunan antioksidan peptitler	7
Tablo 2.	Amino asit kompozisyonu ve pozisyonunun antioksidan aktiviteye etkisi.....	8
Tablo 3.	ESH/ESC 2007'ye göre hipertansiyon sınıflandırması.....	10
Tablo 4.	ADE inhibitörü peptitlerde amino asit çeşidinin aktiviteye etkisi	12
Tablo 5.	Farklı gıda kaynaklarından elde edilen ADE inhibitörü peptitler	13
Tablo 6.	α -laktalbümin ve β -laktoglobülin hidrolizatlarından elde edilen ADE inhibitü peptitler	14
Tablo 7.	Protein miktarı.....	23
Tablo 8.	Hidroliz edilen örneklerin protein miktarı	23
Tablo 9.	Örneklerin % ADE inhibisyon aktivitesi	24
Tablo 10.	Nohut hidrolizatlarının %DPPH inhibisyonları	25

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Renin anjiyotensin sistem	11
Şekil 2.	Bradford standart eğrisi	20
Şekil 3.	% ADE inhibisyonu	24

GİRİŞ

Yüksek kan basıncı veya hipertansiyon koroner kalp hastalıkları, periferik arter hastalığı ve kalp krizi gibi kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür. Yaşam tarzındaki değişiklikler, farklı diyet yaklaşımları ve farmakolojik uygulamalar hipertansiyon tedavisinde etkilidir. Farmasötik ilaçların kuru öksürük, kaşıntı gibi yan etkilerinin olması doğal olarak hipotansif etkiye sahip peptitler içeren gıdalara karşı ilgiyi artırmıştır (1).

Artan epidemiyolojik kanıtlar kardiyovasküler rahatsızlıklar, obezite, hipertansiyon, diyabet ve hatta kanser gibi hastalıklarla diyet arasında kuvvetli bir bağ olduğunu gösterir. Fonksiyonel gıdaların üretilmesi de sağlıkla gıdalar arasında bir ilişki olduğu algısına yanıt niteliğindedir. Bir fonksiyonel gıda genel olarak vücutta bir veya birden fazla fonksiyon üzerinde iyi olma hali sağlayan gıda olarak tanımlanır. Son zamanlarda temel besleyici özelliklerinin dışında gıda prosesi süresince olgunlaşma veya fermantasyon yoluyla, sindirim sırasında enzimler yoluyla oluşan peptitler insan sağlığı üzerinde faydalı etkilere sahiptir. Bu biyoaktif peptitler 2 ile 50 amino asit uzunluğuna sahiptirler ve antimikrobiyel, antioksidan, antitrombotik, antihipertansif ve opioid aktivite göstererek kardiyovasküler sistem, sindirim, endokrin, bağışıklık ve sinir sistemlerini etkilerler (2 ve 3).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) vücutta iki sisteme etki etmek suretiyle kan basıncını düzenler. Bunlardan ilki renin-anjiyotensin sistemidir. ADE bu sistemde bulunan anjiyotensin I'i vazokonstriktör olan anjiyotensin II'ye dönüştürür, aldosteron salınımını indükleyerek sodyum konsantrasyonunu ve dolayısıyla kan basıncını artırır. İkincisi kinin-kalikrein sistemidir. Vazodilatör olan bradikininin parçalar. Antihipertansif biyoaktif peptitler bu enzimi inhibe ederek kan basıncının düşmesine yardımcı olurlar (4).

Son zamanlarda yüksek diyet proteini alımı kan basıncını düşürmede hipertansif bireyler için etkili bir yöntem haline gelmiştir. Diyet ve sağlık arasındaki ilişki hakkında artan tüketici bilgisi farkındalığı, nötrasetik ve fonksiyonel gıda talebini artırmıştır. Bu genellikle sentetik ilaçların yan etkisinden ve artan ilaç masraflarından kaçınma isteğiyle ilişkilidir. Temel besleyici özelliğinin dışında birçok gıda proteini spesifik fizyolojik fonksiyonlara sahip peptit dizileri içerirler. Hastalıktan korunmada veya tedavisinde spesifik gıdaların veya gıda bileşenlerinin kullanılması özellikle hipertansiyonun yönetilmesinde önem taşımaktadır (5). Başka mekanizmaların da rolü olmasına rağmen gıda proteinlerinden sentezlenen biyoaktif peptitlerden kaynaklı ADE inhibisyonu antihipertansif etkiye sebep olur. Spontan hipertansif farelerle yapılan pek çok çalışmada ADE inhibitörü peptitlerce zengin bir diyetle hipertansiyonun baskılanabileceği bulunmuştur (6,7,8,9). Bazı araştırmalar hipertansiyonu olan hastalarda ADE inhibitörü peptitler veya bunları içeren gıdaların tüketiminin antihipertansif etkisi olduğunu göstermiştir (10).

Kuru baklagiller karbonhidrat, protein ve diyet lif kaynağı olmakla birlikte vitamin ve mineral ihtiyacını da karşılar. Son derece besleyici olan baklagiller, yüksek kolesterol ve tip-2 diyabetin düzenlenmesi, bazı kanser türlerinin önlenmesi gibi birçok sağlık özelliğine de sahiptirler (1).

Kuru baklagillerin günlük beslenmemizde önemli bir yere sahip olması, ADE inhibitörleri hakkında baklagillerle yapılan çalışmaların oldukça sınırlı olması, kuru baklagillerde bulunan ADE inhibitörü peptitlerin uygulanacak prosesler sonrasında etkisinin devam edip etmeyeceğinin araştırılması bu sebeple önem kazanmaktadır.

Bu tez çalışmasında nohuta enzim muamelesi ile elde edilen biyoaktif peptitlerin ADE inhibitörü ve antioksidan aktivitesi üzeriene ultrason, , mikrodalga, fermentasyon ve pişirme gibi gıda proseslerinin etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Fonksiyonel Gıdalar

Günümüzde gıdalar sadece açlık duygusunu bastırıp, gerekli besin öğelerini temin etmemizi sağlayan ürünler değil aynı zamanda çeşitli vücut fonksiyonlarımızın düzenlenmesinde rol oynayan, sağlık açısından yararlı araçlardır. Son yıllarda insanlar kimyasal ilaçlar kullanmak yerine doğal olan materyalleri tüketmeyi tercih etmektedirler.

Fonksiyonel gıda teriminin dünyaca kabul edilmiş bir tanımı olmasa da “normal beslenme koşullarının ötesinde sağlığa faydası olan gıdalar” ve “geleneksel gıdalara görünüş olarak benzeyen, normal diyetin bir parçası olarak tüketilmesi tasarlanan, ancak basit besin gereksiniminin dışında fizyolojik roller oynaması için modifiye edilen gıdalardır” (11).

Önceleri fonksiyonel gıdalar sadece vitamin veya minerallerle fortifiye edilmiş besin maddeleri olarak karşımıza çıkmaktaydı (12). Son zamanlarda omega-3 yağ asitleri, fitosteroller, çözünebilir diyet lifler, biyoaktif peptitler ve bunun gibi pek çok makro moleküllerle zenginleştirilmiş gıdalar üzerine yoğunlaşmıştır (13).

1.2. Biyoaktif Peptitler

Yapısal olarak peptitler, birbirine peptit bağı ile bağlanmış kısa aminoasit polimerleridir. Birkaç peptitin birleşmesi ile de proteinler oluşur. Proteinler vücut için gerekli enerjiyi, esansiyel aminoasitleri sağlayan çok önemli besin kaynaklarıdır. Aynı zamanda gıdaların fizikokimyasal ve duysal özelliklerini etkiler ve fonksiyonel aktivite göstererek sağlığa faydalı bileşenler olarak rol oynar. Proteinlerin fizyolojik ve fonksiyonel özelliklerinin zincirde bulunan biyoaktif peptit dizisinden kaynaklandığı

düşünülmektedir. Bu peptitler gastrointestinal sindirim sırasında sindirim enzimleriyle veya *in vitro* proseslerde proteolitik enzimlerle öncül proteinden salınırlar (14).

Biyoaktif peptitler genellikle 2-20 aminoaside sahiptirler (15). Aminoasit dizisine bağlı olarak bu peptitler opioid, antimikrobiyel, antitrombotik, hipokolestrolemik, antihipertansif, antioksidan, immün düzenleyici ve bunun gibi pek çok aktivite gösterirler (16,17).

1.2.1. Opioid peptitler

Opioid aktiviteli gıda kaynaklı peptitler ilk olarak 1970lerin sonunda bulunmuş ve yapısal δ , μ ve κ opioid reseptörlerle interaksiyona giren endojen ligandlara benzediği için ekzorfin olarak adlandırılmıştır. Yaygın yapısal motifleri N-terminalinde bulunan tirozin ve bu pozisyonundan sonraki üçüncü veya dördüncü pozisyonda bulunan aromatik aminositten oluşur (16). Ekzojen opioid peptitler tipik ve atipik olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Tipik olanlarda aynı N-terminal dizisi görülürken (YGGF), atipiklerde sadece N-terminaldeki tirozin aynıdır (18). Pek çok gıda kaynaklı opioid peptit *in vivo* veya *in vitro* sindirim sonucunda oluşan atipik opioidlerdir (14).

Tipik opioid peptitlerin üç öncül proteini vardır. Bunlar proopiomelanokortin (endorfin), proenkalfin (enkalfin) ve prodinorfin (dinorfinler)dir (19). Opioid peptitler vücutta sentezlenebilir(endorfin gibi) veya sindirilmiş gıdalardan absorbe edilebilir(kazomorfinler, ekzorfinler, rubiskolinler gibi). Bu peptitlerin etkileri çok çeşitli olmakla beraber hepsi uyuşturucu benzeri etki gösterir. Beyin opioid peptit sistemleri motivasyonda, duygulanmada, bağlanma davranışında, stres ve acı hissinde ve gıda alımının kontrolünde önemli rol oynamaktadır (20).

1.2.2. Antitrombotik peptitler

Trombosit agregasyonunu ve trombosit yüzey reseptörlerine fibrinojen bağlanmasını inhibe eden peptitler kapa-kazeinin renin ile parçalanması sonucu oluşan glikomakropeptitlerin dizisinde bulunmaktadır (16). Gıda kaynaklı antitrombotik peptitler esas olarak sığır kapa-kazeinin enzimatik hidrolizi ile oluşmaktadır. Son zamanlarda bu peptitler insan ve koyun kapa-kazeininden de izole edilmiştir (21, 22).

1.2.3. Mineral bağlayan peptitler

Ser-Ser-Ser-Glu-Glu dizisini içeren pek çok fosfopeptit sığır kazeininden izole edilmiştir. Bu dizi peptitlere bağırsak pHsında çözeltilerdeki Ca, P ve diğer mineralleri tutma kapasitesi sağlamaktadır. Bu peptitlerin yüksek anyonik karakterleri proteolitik ataklara karşı direnç sağlar, kalsiyum ile çözülebilir kompleks oluşturmalarına izin verir ve çözünmez kalsiyum fosfat oluşumunu engeller (20).

Kazeinofosfopeptitler gibi biyoaktif peptitler demir ve bakır gibi pro-oksidan metallerle şelat yapma yeteneğine sahiptirler ve böylece gıdalarda bozulmaya sebep olan lipid oksidasyonuna karşı koruma sağlarlar. Bu peptitlerin metal şelatlama özellikleri histidindeki imidazol halkasına bağlanmaktadır. Mineral bağlayan peptitler bakır gibi elementleri bağlayarak biyolaşılabilirliğini artırır. Ayrıca rekalsifikasyonda rol oynadıkları için bu peptitlerin dış bakımında kullanılması da amaçlanmaktadır (14).

1.2.4. Antimikrobiyel peptitler

Antimikrobiyel özellikteki peptitler mikroorganizmalarda hayvanlara, bitkilere kadar pek çok doğal kaynaktan bulunmaktadır. Antimikrobiyel peptitler mikrobiyel kaynaklı gıda bozulmalarını, pek çok patojen saldırısını inhibe ederler. Bunların aktivitesi peptit boyutuna, aminoasit kompozisyonuna, yüke, hidrofobikliğe ve ikincil yapıya bağlı olarak değişmektedir (14).

Antimikrobiyel peptitler peynir altı suyunda bulunan laktoferrinden elde edilmiştir. Laktoferrin sütü olan memelilerin pek çok biyolojik sıvısında bulunan demir bağlayıcı bir glikoproteindir. Enzimatik sindirimle oluşan laktoferrisinin antimikrobiyel özelliği daha fazladır. Bunun sebebi ise daha küçük moleküllerin mikrobiyel yüzeydeki hedef noktalara ulaşmasının daha kolay olması olarak açıklanmıştır (23).

Antimikrobiyel peptitlerin büyük bir kısmı değişik bakteri gruplarında ribozomal olarak sentezlenen bakteriyosinlere aittir. Bakteriyosinlerin antimikrobiyel aktivitesi hücresel ve moleküler seviyelerde açıklanmıştır. İnhibisyon peptitlerin membranla ve diğer hücresel bileşenlerle interaksiyonundan kaynaklanmaktadır. Pek çok bakteriyosin mikroorganizmalara karşı öldürücü etkisini hücre duvarını parçalayıp hücre zarından geçirgenliği artırarak göstermektedir (14).

1.2.5. Hipokolesterolemik peptitler

Genellikle diyet proteinlerinin kandaki lipid profilini artırdığı bilinmektedir. Soya, peynir altı suyu ve balık proteinleri hipokolesterolemik etki gösterirken sığır kazeini kolesterol seviyesini artırma eğilimindedir. Yapılan çalışmalar bu etkinin spesifik bir amino asit kompozisyonu ile ilişkili olduğunu kanıtlamıştır. Metionin- glisin ve lisin- arjinin gruplarının düşük olduğu proteinler (soya ve balıkta olduğu gibi) hipokolesterolemik etkiye sahiptir (15).

Soya proteinlerinin toplam plazma kolesterolünü azaltma yeteneği LDL (low density lipoprotein) reseptör ekspresyonunu indüklemeye, safra asidi sentezi ve atımını artırma, bağırsaklardan steroid emilimini azaltma gibi mekanizmalardan kaynaklanmaktadır (24).

1.2.6. Sitomodülatör peptitler

Son zamanlarda yapılan çalışmalar gıda kaynaklı biyoaktif peptitlerin farklı hücre tiplerinin canlılığını etkilediğini göstermiştir. Bazı peptitler kanser hücrelerine karşı seçicilik gösterirken bir kısım peptit seçici değildir. Seçiciliği etkileyen temel faktör tümör hücresiyle normal hücre membranlarının farklı olmasıdır. Tümör hücreleri genellikle negatif yüklüken normal hücreler nötr yüzey yüküne sahiptirler. Bir diğer faktör ise yüzey alanı ve membranın akışkanlığıdır. Kanser hücrelerinin akışkanlığı ve yüzey alanı normal hücrelerden daha fazla olduğu için peptitlerden etkilenmesi daha kolay olmaktadır (25).

Seçici olmayan peptitler ise kanser hücrelerinin yanı sıra bakteriler ve normal hücrelere de etki ederler. Bu özellikleri hem negatif yüklü hem de zwitteriyonik olan hücrelerle etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır (26).

1.2.7. Bağışıklık sistemini düzenleyici (immunomodülatör) peptitler

İmmunomodülatör peptitler doğal protein kaynaklarından gastrointestinal sindirim sırasında salınırlar, böylece immünolojik tepkileri ve hücresel fonksiyonları etkilerler (14).

Etkisi tam olarak bilinmese de bu peptitlerin bağışıklık sistemi hücrelerinin çoğalmasını ve olgunlaşmasını uyardığı düşünülmektedir (20). İmmunomodülatör peptitler lenfosit çoğalması, doğal öldürücü hücre aktivitesi, antikor sentezi ve sitokin düzenlemesi ile bağışıklık sistemi hücrelerinin fonksiyonunu artırabilirler. Ayrıca atopik insanlarda

alerjik reaksiyonları azaltabilir ve gastrointestinal sistemde mukozal bağışıklığı artırabilirler (16).

1.2.8. Antioksidan peptitler

Oksidatif metabolizma hücrelerin yaşam döngüsünde önemli bir yere sahiptir. Bunun serbest radikal ve oksidatif değişikliklere sebep olan diğer radikal oksijen türlerinin oluşumu gibi yan etkileri vardır. Fazla miktarda serbest radikal oluşumu süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz gibi koruyucu enzimleri etkisiz kılabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar antioksidan peptitlerin enzimatik hidrolizle kazeinden ve laktik asit bakterileriyle fermente olmuş sütte elde edilebileceği bulunmuştur (20).

Antioksidan peptitler 5-16 aminoasit içeren, ucuz, sağlıklı, kolay absorbe olabilen, düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir (27).

Tablo 1. Gıdalarda bulunan antioksidan peptitler (27).

Peptit kaynağı	Karakteristik	Hazırlanması	Aktivitesi
Pirinç endospermi	FRDEHKK KHDRGDEF	5 farklı proteaz, en etkili Neutrase	Otooksidasyon, DPPH, süperoksit inhibisyonu ve hidroksil radikal süpürücü aktivite
Yer fıstığı proteini	Moleküler ağırlığı 3-5 kDa olanlar	Farklı proteazlar	Gücü düşürme, LDL oksidasyonu inhibisyonu, DPPH radikal süpürücü ve metal şelatlayıcı aktivite
Suyosunu proteini	VECYGPNRPQF	Pepsin	Hidroksil, süperoksit, peroksil, DPPH ve ABST radikal süpürücü aktivite, DNA üzerinde koruyucu etki, hücre zararı önleme
Kurbağa derisi	LEEEEEELEGCE	Alkalaz, neutrase, pepsin, papain, α -kimotripsin ve tripsin	Lipid peroksidasyonu inhibisyonu, DPPH, süperoksit, peroksil, hidroksil radikal süpürücü
Ayçiçeği proteini	histidin ve arjinin gibi amino asitlerce zengin hidrolizat	Pepsin ve pankreatin	Bakır şelatlama aktivitesi
Mısır gluteni	%41,12 hidrofobik, %12,7 aromatik amino asitlerden oluşan 500-1500 Da peptit fraksiyonu	Alkalaz	Lipid peroksidasyonu azaltıcı güç, süpürücü aktivite
Soya proteini	Moleküler ağırlığı <10 kDa peptitler	Ultrafiltrasyon ve Flavourzyme ile hidroliz	Emülsiyonlarda antioksidan aktivite, radikal süpürücü

Antioksidan peptitlerin etki mekanizması tam olarak anlaşılamasa da, bunlar lipid peroksidasyonunun inhibitörü, serbest radikallerin sürükleyicisi ve metal iyonları geçişinin şelatlarıdır (27).

Peptitlerin antioksidan özelliği daha çok kompozisyonuyla, yapısıyla ve hidrofobitesiyle alakalıdır. Triptofan, tirozin, metiyonin, lisin, histidin antioksidan aktiviteye sebep olan aminoasitlerdir (28). Amino asitlerin aromatik kısmı elektronu eksik radikale proton vererek, radikal süpürücü etkiyi artırır. Histidin içeren peptitlerin antioksidatif etkisinin imidazol grubunun hidrojen verme, lipid peroksil radikal yakalama ve/veya metal iyon şelatlama yeteneğiyle ilgili olduğu düşünülmektedir (29).

Uygun amino asitlerin peptit dizisinde doğru yerde olması da antioksidan aktivitede önemli rol oynar. Yapılan bir çalışmada Leu-Leu-Pro-His-His dizisine sahip sentetik peptitte C-terminalindeki His amino asidinin aktivitede önemli olduğu, bu aminoasit ayrıldığında aktivitede azalma olduğu belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada Pro-His-His dizisinin en yüksek antioksidatif aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda peptitin konfigürasyonu da aktivitede etkili olabilmektedir. Örneğin L-His, D-His'e dönüştüğü zaman aktivitede azalma gözlenmiştir (30). Tablo 2'de amino asit kompozisyonu ve pozisyonun antioksidan aktiviteye etkisi özetlenmiştir.

Tablo 2. Amino asit kompozisyonu ve pozisyonunun antioksidan aktiviteye etkisi (27)

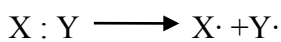
Amino asitler	Etki mekanizması	Örnekler
Aromatik AA (Tyr, His, Trp, Phe)	Rezonans yapısı yoluyla kendisi stabil kalırken, elektron vererek radikali stabil moleküle dönüştürür. Amino asitlerin radikal süpürücü özelliğini geliştirir	N-terminaldeki His, metal şelatlayıcı C-terminaldeki His, radikal süpürücü C-terminaldeki Trp veya Tyr içeren tripeptitler güçlü radikal süpürücü, fakat peroksinitrit süpürmede zayıf
Hidrofobik AA	Hidrofobik radikal türleri ve çoklu doymamış yağ asitlerine (PUFA) erişimi kolaylaştıran lipidlerde peptit çözünürlüğünü artırır, Gly hidrojen donörü olarak davranır	N-terminaldeki Val veya Leu ve dizideki Pro, His, Tyr, Hidrofobik PUFA'lara karşı Ala, Val, Leu alifatik gruplarının yüksek reaktivitesi Terminallerdeki Ala, Leu, glüten peptit dizisindeki Gln ve Pro
Asidik ve bazik AA	Metal iyonlarının şelatörü ve hidrojen donörü olarak yan zincirdeki karboksil ve amino grupları	Fermente midye sosundan purifiye edilen Asp (asidik) ve His (bazik) aminoasitleri
Sistein	SH grubu radikal süpürücüdür, dokuları oksidatif strese karşı korur, glutatyon aktivitesini geliştirir.	Cys içeren tripeptitler peroksinitrit radikallerine karşı güçlü süpürücülerdir

1.2.8.1- Serbest Radikaller

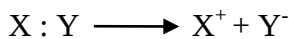
Serbest radikaller eşlenmemiş elektron içeren, bu nedenle kararsız ve oldukça reaktif moleküllerdir. Bu reaktif moleküller proteinlere zarar verebilir, DNA mutasyonuna sebep olabilir, membrandaki fosfolipidlerin oksidasyonuna neden olabilir veya düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) modifikasyonuna sebep olabilir.

Serbest radikaller üç şekilde ortaya çıkabilir:

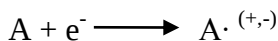
1- Kovalent bağ taşıyan molekülün homolitik yıkımı (homolitik yıkımda elektronlar her iki atomda da ortak elektronlardan biri kalır);



2- Kovalent bağlı molekülün heterolitik yıkımı (heterolitik yıkımda kovalent bağ oluşturan elektronların ikisi de tek bir atomda kalır) ya da tek bir elektron kaybetmesi;



3- Moleküle elektron eklenmesi (31);



Serbest radikallerin oluşum mekanizması şu şekilde incelenebilir:

1-Otooksidasyon: Atmosferdeki oksijenin katalizlediği tipik bir oksidasyon türüdür. Çoklu doymamış yağ asitleri ve fosfolipidler otooksidasyona uğrama eğilimindedir.

2-Geçiş metal iyonlarının etkisi: Demir ve bakır gibi geçiş metalleri oksidasyonu katalizlemektedir.

3-Fotooksidasyon: Fotokimyasal iz yolları, peroksit oluşumunda rol oynar. Peroksitler ise oksidasyonlarda başlatıcı olarak görev yapmaktadırlar.

4-Enzimatik oksidasyon: Reaktif oksijen türleri bazı enzimlerin aktiviteleri sonucunda da oksidasyona uğrayabilmektedir (32).

1.2.9. Antihipertansif peptitler

1.2.9.1. Hipertansiyon

Hipertansiyon kardiyovasküler hastalıkların gelişmesinde en önemli risk faktörüdür. Kontrol altına alınmadığı takdirde kalp yetmezliği, kalp krizi, böbrek hastalıkları, felç, görme kaybı, damar tıkanıklığı gibi ciddi rahatsızlıklara sebep olabilir.

Avrupa Hipertansiyon Derneği ve Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESH/ESC)'nin ateryal hipertansiyon tedavisi kılavuzunda hipertansiyon Tablo 3'teki gibi sınıflandırılmıştır (33).

Tablo 3. ESH/ESC 2007'ye göre hipertansiyon sınıflandırması

Kategori	Sistolik (mmHg)	Diastolik (mmHg)
İdeal	<120	<80
Normal	120-129	80-84
Yüksek normal	130-139	85-89
Evre1 hipertansiyon	140-159	90-99
Evre2 hipertansiyon	160-179	100-109
Evre3 hipertansiyon	≥ 180	≥ 110
İzole sistolik hipertansiyon	≥ 140	<90

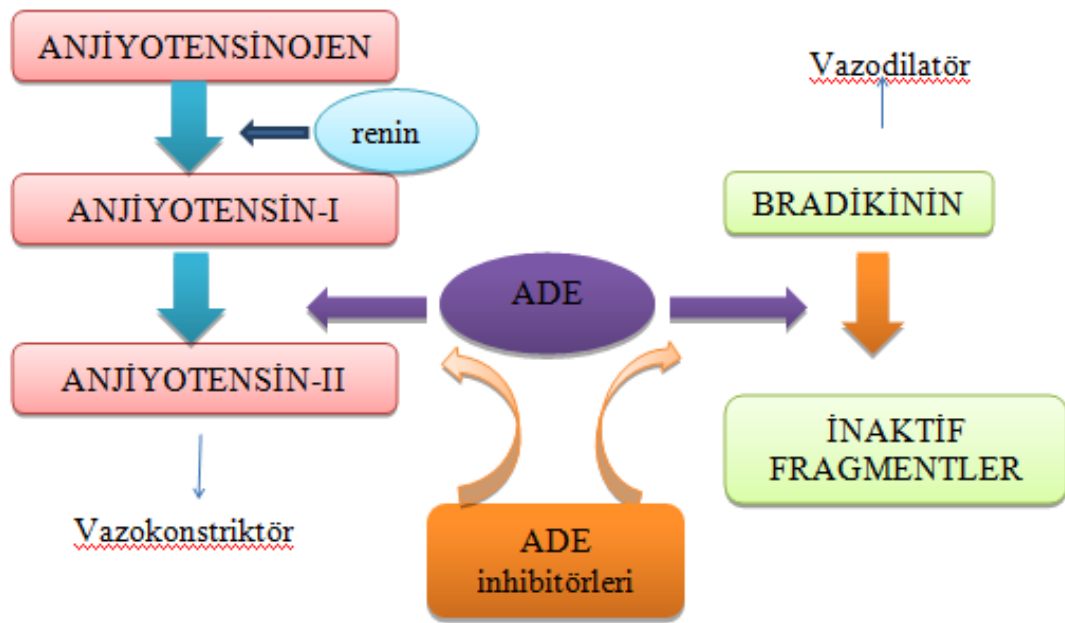
Bu sınıflandırmaya göre sistolik kan basıncı 140 mmHg ve diastolik kan basıncı 90mmHg üzerinde olanlarda ilaç tedavisi gerekmektedir. Ancak sınıflandırmaya göre yüksek-normal grup içerisinde yer alan kişilerde hayat koşullarının değiştirilmesiyle tansiyonun dengelenebileceği bildirilmiştir (33).

Hipertansiyon dünya nüfusunun ciddi bir kesimini tehdit altına almıştır. Bazı Avrupa ülkeleri ile Amerika'da yapılan epidemiyolojik çalışmaların sonucunda Amerika'da yetişkin popülasyonda hipertansiyon prevalansı %27,6 iken Avrupa ülkelerinde ortalama %44,2 bulunmuştur. Kore'de yapılan çalışmada prevalans %33,7 olarak tespit edilmiştir(34). Türk hipertansiyon prevalansı (patenT) çalışmasına göre ülkemizde her üç kişiden birinde bu hastalık gözlenmektedir (35). Son verilere göre bu hastaların sadece % 54,7'si hipertansiyonun farkındadır (36). Ülkemizde her dört ölümden birinin sebebi hipertansiyondur (37).

1.2.9.2. Renin-anjiyotensin sistem (Şekil 1)

Kan basıncı renin-anjiyotensin sistem (RAS) ve kinin-nitrik oksit (NO) sistem olmak üzere iki şekilde kontrol edilir. RAS anjiyotensinojen aktivasyonunu içerir. Bu

aktivasyon anjiyotensinojenin reninin proteolitik aktivitesi sonucu anjiyotensin-I (AT-I)'e dönüşmesi ile meydana gelir. AT-I, ADE (peptidildipeptit hidrolaz, EC 3.4.15.1) ile C-terminalinde bulunan histidil grubundan parçalanarak AT-II'ye dönüşür. Kuvvetli bir vazokonstriktör olan AT-II, vücuttaki dokularda bulunan reseptörlere bağlanarak normal kan basıncının devam edebilmesi için kan damarlarının daralmasını sağlar. Enfeksiyon olduğu durumlarda aşırı AT-II seviyesi kan damarlarının çok fazla daralmasına ve kan basıncının yükselmesine sebep olur. Kinin-NO sistemi ise kuvvetli bir vazodilatör olan bradikinin üretiminden sorumludur. Bradikinin NO üretilmesi için gerekli olan nitrik oksit sentaz aktivasyonunu sağlayan hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu artırarak antihipertansif etki gösterir. ADE bradikininin parçalanmasına sebep olarak iki sistem üzerinden kan basıncını artırır (38).



Şekil 1. Renin anjiyotensin sistem

1.2.9.3. ADE inhibitörü peptitler

Yılan zehrinde keşfedildiğinden beri pek çok ADE inhibitörü peptit çeşitli gıda proteinlerinden izole edilmiştir. Bu peptitler genellikle kısa zincirlidir ve çoğunlukla prolin gibi polar amino asitler içerirler (16).

Gıda kaynaklı peptitler ile ADE inhibisyon mekanizması yarışmacı bir inhibisyonudur. Bu tip inhibisyonlarda peptitler, enzimin katalitik bölgesi için ADE substratı ile yarışır. Bunun yanında yarışmacı olmayan (Leu-Trp, Ile-Tyr) ve enzime başka bölgeden bağlanarak aktivasyonunu azaltan (Ile-Trp, Phe-Tyr) peptitler de vardır.

Araştırmalar sonucunda hidrofobik amino asitlerin ADE inhibitör aktivitesini etkileyen faktörler arasında önemli bir yere sahip olduğu bulunmuştur. C-terminaldeki prolin, triptofan, fenilalanin ve tirozin gibi hidrofobik amino asitlerle, N-terminaldeki lösin, izolösin ve valin gibi alifatik amino asitler ADE inhibisyonunda önemli yapısal özelliklerdir (39). Ayrıca amino grubunda pozitif yük olan arjinin ve lisin gibi amino asitlerin C-terminalde bulunması da inhibisyon aktivitesine katkı sağlar (40). C-terminalinde prolin veya hidroksprolin bulunan di/tri- peptitlerin sindirim enzimlerine karşı dirençli olduğu kanıtlanmıştır (41). İki veya üç amino asit içeren kısa peptitlerin serbest amino asitlere göre daha kolay absorbe edildiği (42), zincir uzadıkça aktivitenin azaldığı belirtilmiştir (43). Tablo 4'te yapısal özelliklerin peptitler üzerindeki etkileri, Tablo 5'te ise farklı gıda kaynaklarından elde edilen ADE inhibitörü peptit örnekleri verilmiştir.

Tablo 4. ADE inhibitörü peptitlerde amino asit çeşidinin aktiviteye etkisi (15)

Aktivite	Yapısal eleman	Özellikler
ADE inhibitörü	C-terminalde Pro ya da hidroksi-Pro olması	Sindirim enzimlerine karşı direnç kazandırır
	C-terminalde Pro, Lys ya da Arg olması	İnhibitör aktivitesini artırır
	C-terminalinde Tyr ya da Phe olması	Tyr olan dipeptitlerin, Phe bulunanlara göre daha fazla aktivite gösterdiği bulunmuştur

Tablo 5. Farklı gıda kaynaklarından elde edilen ADE inhibitörü peptitler (44)

Kaynak	Hidrolizde kullanılan proteaz	Aktif dizi	IC ₅₀ değeri
Sığır eti	Termolisin+ proteinazA	VLAQYK	23.2µg/mL
Palamut	Pepsin	PNRIKYGD	
		HERDPHTIKWGD	
		PTHIKWGD	
		FHERDPHTIKWGD	
		TKTGRSAHVLSRYRPRA	
İnsan plazması	Tripsin	KKPTHIKWGD	
		YLYEIAR	16µM
Süt kazeini	Pepsin	RYLGY	0.71 µM
		AYFYPEL	6.58 µM
		YQKFPQY	20.08 µM
Süt kazeini	Tripsin	FFVAPFPEVFGK	82 µg/mL
		TTMPLW	13 µg/mL
		AVPYPQR	13 µg/Ml
		FALPQY	4.3 µM
		FALPQYLK	
Süt kazeini	Nötraz	YQKFPQY	
		LPQNIPPL	
		SKVLPVPQK	
		LPYPYY	
Süt kazeini	<i>L. helveticus</i>	FLPYPYY	
		KVLPVP	5 µM
Süt serumu	Proteaz K	VWPFPG	
		GKP	
		IPA	
		FP	
		VWP	
Süt serumu	Termolizin	LQKW	3.5 µM
		LLF	82.4 µM
Fermente süt		GTW	464.4 µM;
		GAW	240.0 µM
Karabuğday	Pepsin, tripsin, kimotripsin	YQY	4 µM
		PSY	16 µM
		GPP	23.1 µM
Brokoli		YPK	10.5 µg/mL
Maş fasulyesi	Alkalaz	KDYRL	26.5 µM
		VTPALR	82.4 µM
		KLPAGTLF	13.4 µM
Soya fasulyesi	Alkalaz 2.4 L	DLP	4.8 µM
		DG	12.3 µM
Soya fasulyesi 11S globülin	Proteaz P	VLIVP	1.69 µM
Ayçiçeği	Pepsin+pankreatin	FVNPQAGS	6.9 µM
Buğday gliadini	Pepsin+proteaz	M IAP	2.7 µM

Gıda kaynaklı ADE inhibitörü peptitler süt, et ve baklagil kaynaklı olarak sınıflandırıp incelenebilir.

1.2.9.3.1. Süt kaynaklı ADE inhibitörü peptitler

Sütte bulunan biyoaktif peptitler çoğunlukla protein dizisi içinde inaktif halde bulunduklarından aktivite gösterebilmeleri için enzimatik hidroliz gibi işlemlere gerek duyulur. Süt kaynaklı biyoaktif peptitler vücuda alındıktan sonra in vivo yolla üretilbildiği gibi fermantasyon veya peynir üretiminde kullanılan bakteri türleri de biyoaktif peptitlerin salınımına katkıda bulunur. Süt proteinlerinin pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi gastrointestinal proteinazlarla in vitro inkübasyonunun ADE inhibitör peptit salınımıyla sonuçlandığı bilinmektedir (9).

Kazein kaynaklı pek çok ADE inhibitör peptit tanımlanmıştır. Bunlar majör peynir altı suyu proteinlerinin ADE inhibitör peptit içerdiğini kanıtlar niteliktedir. Alfa-lakalbumin ve beta-laktoglobülin kaynaklı bazı peptitler Tablo 6'da gösterilmiştir (45).

Tablo 6. α -laktalbumin ve β -laktoglobülin hidrolizatlarından elde edilen ADE inhibitö peptitler (45).

Uygulanan işlem	Tanımlanan peptit bölümü	Aminoasit dizisi	IC50 (μ M)
α-laktalbumin			
Pepsin ardından tripsin ve kimotripsin	α -laktalbumin f(50-52)	YGL	409
Pepsin	α -laktalbumin f(50-53)	YGLP	733
Tripsin	α -laktalbumin f(99-108)	VGINYWLAHK	327
	α -laktalbumin f(104-108)	WLAHK	77
β-laktoglobülin			
Tripsin	β -laktoglobülin f(22-25)	LAMA	556
	β -laktoglobülin f(32-40)	LDAQSAPLR	635
	β -laktoglobülin f(81-83)	VFK	1029
	β -laktoglobülin f(142-148)	ALPMHIR	43
Pepsin ardından tripsin ve kimotripsin	β -laktoglobülin f(94-100)	VLDTDYK	946
	β -laktoglobülin f(106-111)	CMENSA	788
	β -laktoglobülin f(142-146)	ALPMH	521
	β -laktoglobülin f(102-105)	YLLF	172

Yapılan çalışmalardan çıkan sonuçlara göre ADE inhibisyonu için gastrointestinal sindirim esansiyel bir faktördür. Örneğin KVLPVPE (β -laktoglobülin f 169-175) dizisi düşük bir ADE inhibitör potansiyeline sahipken ($IC_{50} > 1000\mu M$), pankreatin ile hidrolizi sonucu oluşan KVLPVP dizisi ($IC_{50}=5\mu M$) spontan hipertansif farelerdeki antihipertansif aktiviteden sorumludur (46).

In vitro hidroliz yaklaşımında karşılaşılan zorluk protein ve enzim kombinasyonunun doğru ayarlanmasıdır. Çalışmalar, hem kazein hem de peynir altı suyunda ADE inhibitör peptit salınımı için temolisin çok iyi bir enzim olduğunu göstermiştir. Deneylerde α -laktalbuminden termolisin aktivasyonu ile elde edilen hidrolizat en yüksek ADE inhibisyon aktivitesini göstermiştir. β - kazeinin termolisin ile hidrolizinden izole edilen peptitler ise ikinci en yüksek ADE inhibitör aktivitesini göstermiştir (47).

Alfa-laktalbumin hidrolizatından tanımlanan ADE inhibitörü aktivitesine sahip bütün peptitlerin C-terminalinde aynı diziye sahip olduğu, bu peptitlerin C-terminalinde bulunan aminoasitler ADE ve inhibitörüne bağlanmada çok önemlidir. Bu çalışmadaki peptitlerin C-terminalinde prolin ve triptofanın bulunması ADE aktif bölgesine bağlanmada esansiyel olduğu tahmin edilmektedir. Buna karşılık glutamik asit varlığı bağlanmayı ve dolayısıyla inhibitör aktiviteyi azaltmaktadır (48).

Biyoaktif peptit elde etmenin bir yolu da fermentasyondur. Çok sayıda biyoaktif peptit içeren fermente süt geleneksel yoğurt üretiminde kullanılan *Lb.delbrueckii* subsp.bulgaricus ve *Streptococcus thermophilus*'un yanı sıra *Lb.helveticus*, *Lb.casei*, *Lb.plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb.acidophilus*, *Lactococcus lactis* subsp.lactis ve subsp.cremoris gibi laktik asit bakterilerinin proteolitik türleri kullanılarak üretilir (49). Fermentasyon sırasında biyoaktif peptitlerin öncülü olan pek çok uzun zincirli oligopeptit kazein degradasyonu ile serbest kalır. Fermente süt ürünlerinde laktik asit bakterilerinin hücre içi peptidazları ileri düzey degradasyonlara katkıda bulunur (50, 51).

Bilinen en iyi ADE inhibitör peptitler VPP ve IPP, sütün *Lb.helveticus* ve *Saccharomyces cerevisiae* türleri ile fermentasyonundan elde edilen Japon içeceği Calpis'den izole edilmiştir. IC_{50} değerleri sırasıyla 9 ve 5 μM olan bu iki peptit antihipertansif ilaç olan captopril'den 704 kat daha etkilidir. Farelerde Calpisin oral

olarak alınmasından 6 saat sonra VPP ve IPP aort dokusunda tespit edilmiş ve aorttaki ADE aktivitesi kontrole göre daha düşük gözlenmiştir (52). Ayrıca 21 hafta ve 10 hafta boyunca 150mg/gün fermente sütle beslenen hipertansif deneklerde kan basıncında azalma izlenmiştir (53, 54). Bu tripeptitlerin hiç bir yan etkisi görülmemiştir (55).

Gama amino-bütirik asit (GABA) protein olmayan aminoasittir. Hipotansiyonu indükler, diüretik etkisi vardır ve antitümörjenik aktiviteye sahiptir. GABA ile zenginleştirilmiş fermente süt içecekleri hipertansif insanlarda kan basıncını düşürmüştür (56).

Kımızdan alınan mayalarla fermente edilen sütte ADE inhibitör aktivitesi gözlenmiştir. Bazı maya türleri acı tat meydana getirmiştir. Bunun sebebi C-terminalde bulunan fenilalanin olabileceği belirtilmiştir. *P. kudriavzevii* KL84A and *K. marxianus* KL26A türlerinin acılık oluşturmamakla birlikte ADE inhibitör aktivitesine katkı sağladığı bildirilmiştir (57).

Fermantasyon bitimindeki ve soğuk depolama zincirindeki pH değeri ürünlerin ADE inhibitör aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Analizler fermantasyon sırasında ADE inhibitör aktivitesinin pH 4.6'dan 4.3'e kadar arttığını göstermiştir. Fakat pH3.5'te aktivite gözlenmemiştir (58).

1.2.9.3.2. Et kaynaklı ADE inhibitörü peptitler

Sığır göğüs kası protein hidrolizatında yapılan çalışmalar sonucunda kontrol olarak kullanılan Captopril'in 0.015 µg/µL protein konsantrasyonunda 87.8 ± 3.39 ADE inhibitör aktivite göstermesine karşılık örnekler 12.68 ± 1.48 µg/µL protein konsantrasyonunda 49.82 ± 10.94 ADE inhibitör aktivite göstermiştir. Aynı çalışmada 3k-Da filtratlar daha yüksek aktivite göstermiştir (59).

L. sakei CRL1862 ve *L. curvatus* CRL705 ile fermente edilen domuz etindeki sarkoplazmik proteinlerde ADE inhibitör peptitlerin açığa çıktığı gösterilmiştir (60).

1.2.9.3.3. Baklagil kaynaklı ADE inhibitörü peptitler

Baklagiller yüksek protein içerikleriyle dikkat çekmektedir. Pek çok çalışma soya, nohut, kuru fasulye ve mercimek gibi baklagillerde ADE inhibitör aktiviteye sahip peptitlerin varlığını kanıtlar niteliktedir.

Kırmızı ve yeşil mercimekle yapılan bir çalışmada hidroliz edilmeyen örneklerde ADE inhibitör aktivitenin gözlenmediği, buna rağmen çeşitli enzimlerle hidroliz edilenlerde değişen miktarlarda aktivite izlenmiştir (61). Kırmızı mercimekle yapılan diğer bir çalışmada protein fraksiyonlarına ayrılarak her birinde ayrı ayrı aktivite incelenmiştir. En düşük IC₅₀ değerinin toplam proteinde (440±4 µg/mL veya 111µmol/L) gözlendiği, bunu legumin, albumin ve visilin fraksiyonlarının izlediği bildirilmiştir (62). Torino ve arkadaşları (63) mercimeğin fermentasyonunun antihipertansif bileşenleri (GABA ve ADE inhibitör peptitler) açığa çıkardığını belirtmişlerdir.

Fermente soya ürünleri olan natto ve tempeh ADE inhibitör aktivite gösteren peptitlerin yanı sıra pek çok biyoaktif peptit de içermektedir. Soya fayülesinin en temel proteinlerinden olan glisin, bu peptitlerin öncülü olduğu düşünülmektedir (64). Çin'in geleneksel ürünü olan, soyanın fermente edilmesiyle hazırlanan douchinin fermentasyon boyunca ADE inhibitör aktivitesi incelendiğinde iki haftalık fermentasyon süresinde aktivitenin devamlı arttığı fakat süre uzadıkça azalmaya başladığı görülmüştür (65). Japonya'da tüketilen fermente pirinç ve soya fasulyeinden hazırlanan misoda da fermentasyon süresince ADE inhibitör aktivitenin arttığı bildirilmiştir. Bunun yanında kazein ilavesiyle hazırlanan misodan izole edilen tripeptitlerin (Val-Pro-Pro ve Ile-Pro-Pro) spontan hipertansif farelerde tansiyonu düşürdüğü belirtilmiştir (66).

Bakla (*Parkia speciosa*) kullanılan bir çalışmada alkalaz ile hidroliz edildiğinde %80.2 ADE inhibitör aktivitesi gösteren peptitler izole edilmiştir (67).

Nohut ve bezelyenin çeşitli enzimlerle hidroliz edilmesiyle elde edilen peptitlerin ADE inhibitör aktivite gösterdiği bulunmuştur. Aynı çalışmada baklagil peptitlerinin sağlıklı fonksiyonel gıda üretiminde katkı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (68). Proteaz alkalaz kullanılarak hazırlanan nohut hidrolizatları ADE inhibitör aktiviteli peptitlerce zengindir. Bu spesifik peptitlerin izolasyonu ters faz kromatografi ile mümkün olabilmektedir. Ayrıca bu peptitlerin in vivo antihipertansif etki gösterebileceği bildirilmiştir (69). Kuru nohutun taze nohuttan daha fazla ADE inhibitör aktiviteye sahip olduğu, yüksek tansiyon tedavisinde fonksiyonel gıda olarak tüketilebileceği belirtilmiştir (70).

2. BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Kayseri’de yerel bir marketten satın alınan nohut (*Cicer arietinum* L) örnekleri kullanılmıştır. *Lactobacillus plantarum* (ATCC kodu 8014) Mikrobiologics’ten, pepsin, tripsin, ADE ve HHL Sigma Aldrich’ten temin edilmiştir.

2.2. Metot

2.2.1. Öğütme

Ham protein ekstraktı elde etmek için ön işlem uygulanmayacak nohut örnekleri öğütücüde (Warke-M20, IKA, Almanya) 0.5 mm’lik elekten geçecek şekilde öğütülmüştür.

2.2.2. Nohut protein izolatu eldesi

Öğütülmüş nohut örneklerine 1:10 oranında distile su ilave edildikten sonra 1N NaOH ile pH 9’a ayarlanmış ve oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmıştır. Süspansiyon 5°C’de 4000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenerek (NF800R, Nüve ,Türkiye) çözünmeyen katı partiküllerin ayrılması sağlanmıştır. Üstte kalan sıvı kısım alınarak 2N HCl ile pH 4.5’a ayarlanarak izoelektrik çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında yarım saat karıştırmanın ardından 4000 rpm’de 20 dakika 5°C’de santrifüj edilerek süpernatant ve pelet birbirinden ayrılmıştır. Pelet 1:5 oranında su ile süspanse edilip pH’sı 4.5’e ayarlanarak 30 dakika karıştırılmak suretiyle yıkanmıştır. Aynı şartlarda tekrar santrifüjlenerek elde edilen çökelti alınıp 1:2 oranında su ile süspanse edilip pH’sı 7’ye ayarlanmıştır. Konsantre protein -20° C ’de analiz edilene kadar saklanmıştır.

2.2.3. Fermantasyon

Öğütülmüş nohut örneklerine %10 (v/v) *Lactobacillus plantarum* eklenerek steril distile suyla 200 g/L süspansiyon hazırlanmıştır. 48 saat boyunca 150 rpm hızdaki çalkalamalı inkübatörde 37°C’de inkübasyona bırakılarak fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Fermantasyondan sonra örnekler -20°C’de dondurularak muhafaza edilmiştir (71).

2.2.4. Pişirme

Bütün haldeki nohut örneklerine beherde 1:10 oranında (w/v) su ilave edilerek 60 dakika boyunca 100°C’de kaynatılarak pişirilmiştir. Kaynatma sırasında su ilavesiyle seviyesinin sabit kalması sağlanmıştır. İşlem sonunda örnekler süzülerek oda sıcaklığına soğutulmuş ve öğütülmüştür.

2.2.5. Ultrason uygulaması

Bütün haldeki nohut örneklerine beherde 1:10 oranında (w/v) su ilave edilerek 20 dakika (150 W güçte) boyunca ultrasona (S60, Elmasonic, Singen) tabi tutulmuştur. İşlem sonunda örnekler süzülerek oda sıcaklığına soğutulmuş ve öğütülmüştür.

2.2.6. Mikrodalga uygulaması

Bütün haldeki örneklere beherde 1:10 oranında (w/v) su ilave edilerek 20 dakika boyunca mikrodalga (MW796, Kenwood, Çin) uygulanmıştır. Kullanılan frekans 2450 MHz’dir. İşlem sonunda örnekler süzülerek oda sıcaklığına soğutulmuş ve öğütülmüştür.

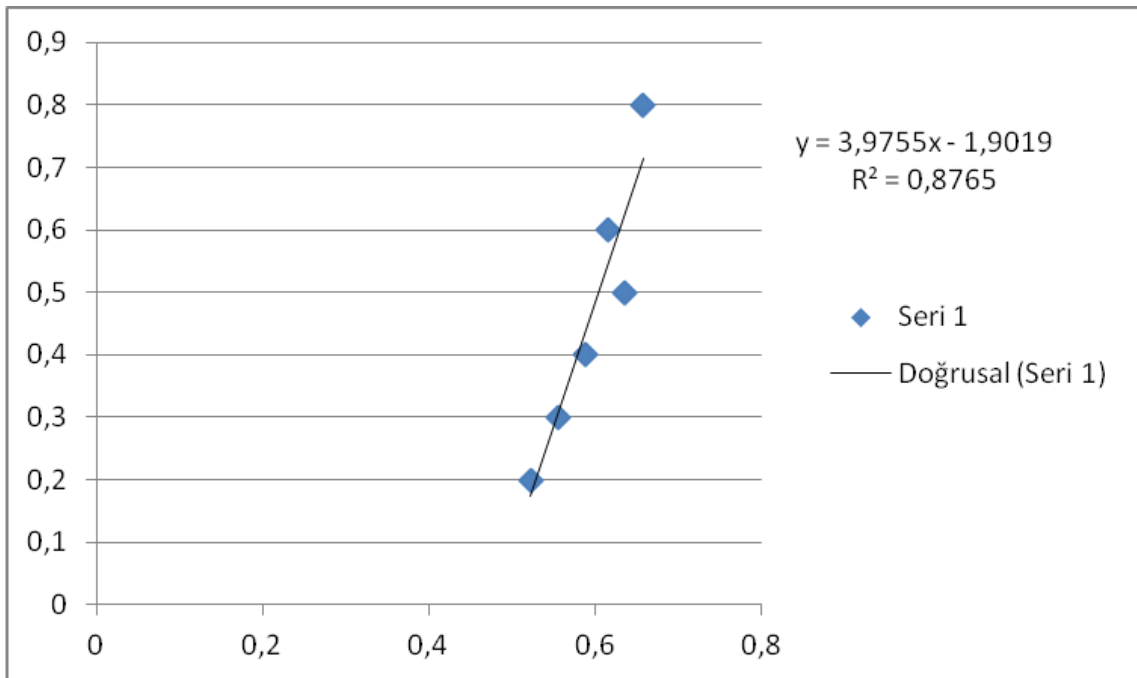
2.2.7. Protein hidrolizi

Pprotein izolatından 100 mL alınarak 2M HCl ile pH 2’ye ayarlanmıştır. 1/250 (w/w) enzim substrat oranında pepsin eklenerek 37°C’de inkübasyona bırakılmış, 2 saat sonra pH 6.5’e ayarlanarak yine 1/250 (w/w) enzim substrat oranında tripsin eklenerek solüsyon 37°C’de 2.5 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda pH 4.5’e ayarlanarak 4°C’de 4000rpm hızda 15 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant -20°C’de muhafaza edilmiştir (40).

2.2.8. Protein miktarının belirlenmesi

Nohutten elde edilen izolatların ve enzimatik hidroliz sonrası elde edilen hidrolizatların protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Bradford yöntemi coomasie brilliant blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Mavi rengin oluşmasında proteinin aminoasit bileşimi önemlidir. Boyanın özellikle arjinin gibi bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir.

Analizlerde boya 1/50 seyreltilip, Watman No:1'den süzülerek kullanılmıştır. Örnekler 1/100 oranında seyreltilerek analiz edilmiştir. U tabanlı mikropalakaya 40µL örnek ve 200µL boya eklendikten sonra 1 dakika karıştırma, 10 dakika bekleme olacak şekilde toplam 11 dakika beklenilmiştir. 620nm dalga boyunda microreader (Multisan FC) , ile absorbans değerleri okunmuştur. 1mg/mL BSA stoğu kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanana protein çözeltisinin, standart grafiği oluşturulmuş ve örneklerin protein miktarı bu grafikten (Şekil 2) elde edilen regrasyon denkliği kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 2. Bradford standart eğrisi

2.2.9. ADE inhibisyon aktivitesi

Aktivite tayini bazı modifikasyonlarla Cushman and Cheung (72) metodu esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu metotta hippuril-L-histidil-L-lösin'den, ADE aktivitesi sonucu oluşan hippurik asit absorbansı ölçülmektedir. Analize başlamadan önce 5 mmol/L hippuril-L-histidil-L-lösin (HHL) çözeltisi 0.3 M NaCl içeren 0.1 M sodyum borat tamponunda çözülerek hazırlanmıştır. 0.1 U/mL ADE çözeltisi aynı tamponla hazırlanmıştır. 20 µL HHL ile 80µL protein hidrolizatı karıştırılarak 37°C'de 5 dakika bekletilmiş daha sonra 20 µL ADE çözeltisi eklenerek 37°C'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 100 µL 1M HCl çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Hippurik asit ekstraksiyonu için 1.2 mL etil asetat eklenerek vortekslenerek 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan etil asetat 1mL alınarak temiz bir tüpe aktararak, 100°C'deki tabaka ısıtıcı kullanılarak etil asetat tamamen uçurulmuştur. Kalan kısım 3 mL saf su ile çözülerek 228 nm'de absorbansı okunmuştur. ADE inhibitör aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\%inhibisyon = \frac{B-A}{B-C} * 100$$

A: örnek absorbansı

B: kör absorbansı (örnek yok)

C: pozitif kontrol absorbansı (ADE yok)

2.2.10. DPPH radikal süpürme aktivitesi

Örneklerin DPPH üzerindeki serbest radikal süpürme aktiviteleri Sanchez-Moreno et al. (73)'a göre gerçekleştirilmiştir. Hidroliz edilen örneklerin farklı konsantrasyonda çözeltileri ve metanol içinde 0.1 mM DPPH çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan örnek çözeltilerinden 100 µL alınıp DPPH çözeltisinin 3500 µL'sine ilave edilerek, vorteks yardımıyla karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra UV spektrofotometresinde 517 nm'de absorbansı okundu. Kontrol örneğinde, örnek yerine çözücü kullanılarak spektrofotometre saf metanol ile sıfırlandı.

30 dakika sonucunda reaksiyon ortamındaki inhibe olan DPPH miktarı aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 \times (1 - A_{\text{Ö}}/A_{\text{K}})$$

$A_{\text{Ö}}$: Örneğin absorbansı

A_{K} : Kontrolün absorbansı

2.2.11. İstatistik Analiz

Verilerin istatistik analizi SPSS 15.0 programı Kruskal-Wallis ve ANOVA testleri kullanılarak yapılmıştır.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Protein Miktarı

Herhangi bir işlem uygulanmamış, fermentasyon, pişirme, ultrason ve mikrodalga işlemleri uygulanmış nohut örneklerinin protein miktarları Tablo 7’de gösterilmiştir. Buna göre protein miktarı en fazla mikrodalga uygulanan nohutta daha sonra sırasıyla ham, fermente, pişirilmiş ve ultrason uygulanan nohutta görülmüştür.

Tablo 7. Protein miktarı

Örnek Adı	Protein miktarı (mg/mL)
Ham nohut	$2,50 \pm 0,61^a$
Fermente nohut	$1,94 \pm 0,35^{a, b}$
Piştirilmiş nohut	$1,67 \pm 0,5^b$
Ultrason uygulanmış nohut	$1,66 \pm 0,26^b$
Mikrodalga uygulanmış nohut	$2,66 \pm 0,3^a$

Aynı sütundaki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$)

Enzimatik hidrolize tabi tutulan nohut örneklerinin protein miktarları Tablo 8’de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre protein miktarı sıralandığında büyükten küçüğe doğru sırasıyla mikrodalga uygulanmış, pişirilmiş, ultrason uygulanmış, fermente ve ham nohut gelmektedir.

Tablo 8. Hidroliz edilen örneklerin protein miktarı

Örnek Adı	Protein miktarı(mg/mL)	Hidroliz verimi (%)
Ham nohut	$0,249 \pm 0,27^a$	9,96
Fermente nohut	$0,324 \pm 0,03^a$	16,69
Piştirilmiş nohut	$0,513 \pm 0,17^a$	30,69
Ultrason uygulanmış nohut	$0,353 \pm 0,16^a$	21,27
Mikrodalga uygulanmış nohut	$0,577 \pm 0,03^a$	21,71

Aynı sütundaki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$)

3.2. ADE inhibitör aktivitesi

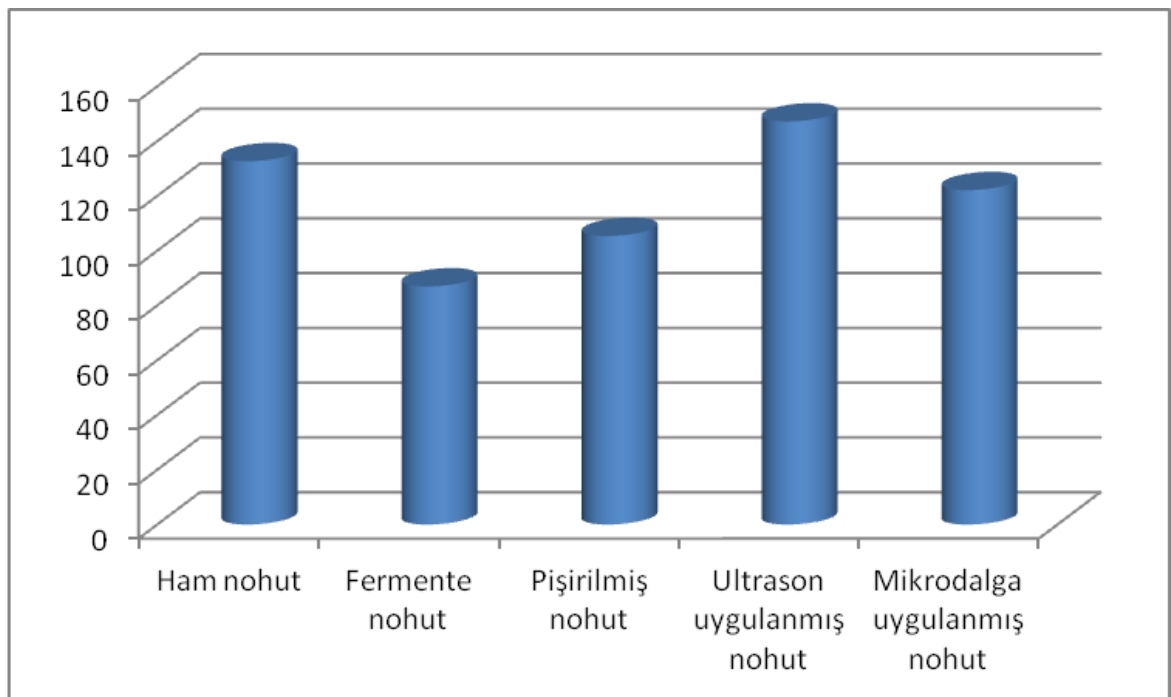
Örneklerin hepsinde oldukça yüksek oranda ADE inhibitör aktivitesi gözlenmiştir. İnhibisyon çalışmalarında örnek çok yoğun olduğunda %100'ün üzerinde sonuçlar bulunabilmektedir.

Aşağıdaki grafikte çeşitli işlemler uygulanmış nohutların ADE inhibisyon aktiviteleri gösterilmiştir. Aktivite büyükten küçüğe sıralandığında ultrason uygulanmış, ham, mikrodalga uygulanmış, pişirilmiş ve fermente nohut olduğu görülmektedir.

Tablo 9. Örneklerin % ADE inhibisyon aktivitesi

Örnek adı	%ADE inhibisyonu
Ham nohut	132,7 ^a
Fermente nohut	86,9 ^a
Piştirilmiş nohut	105,4 ^a
Ultrason uygulanmış nohut	147,2 ^b
Mikrodalga uygulanmış nohut	122,1 ^a

Aynı sütundaki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$)



Şekil 3. %ADE inhibisyonu

3.3. DPPH radikali süpürme aktivitesi

DPPH radikali süpürücü aktivite %inhibisyon Tablo 10’da verilmiştir. Değerler 0,01 mg örnek/mL konsantrasyonu için hesaplanmıştır.

Tablo 10. Nohut hidrolizatlarının %DPPH inhibisyonları

Örnek adı	%İnhibisyon
Ham nohut	6,01 ± 0,62 ^a
Fermente nohut	10,30 ± 6,60 ^a
Piştirilmiş nohut	6,92 ± 0,22 ^a
Ultrason uygulanmış nohut	4,11 ± 1,35 ^a
Mikrodalga uygulanmış nohut	6,89 ± 1,78 ^a

Aynı sütundaki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0,05)

En yüksek DPPH inhibisyonu fermente edilen örneklerde görülmüştür (%10,3). Bunu sırasıyla piştirilmiş, mikrodalga uygulanmış ve ham örnekler izlemiştir. Ultrason uygulanan örneklerde ise DPPH inhibisyon aktivitesi en az bulunmuştur. Sonuçlar arasında istatistik bir farklılık yoktur.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA

Mondor ve arkadaşları (75), işlem görmemiş nohutta protein miktarını 22,3 ile 18,9 (%kuru madde) gram olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada verilen sonuçlar mg/mL cinsinden olduğu için sonuçların farklı çıkması doğaldır. Örneğin barbunya kullanılan bir çalışmada protein miktarı 0,1463 mg/mL olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise protein miktarı 2,66 ile 1,66 mg/mL arasında değişmektedir.

Mikrodalga uygulanan örneklerde protein miktarındaki artış istatistik olarak önemli değildir ($p>0,05$). Bradford metodunda boya arjinin gibi bazik amino asitlere daha çok bağlanmaktadır. Börülce ile yapılan bir çalışmada örneklere otoklav, kaynatma, fermantasyon, mikrodalga gibi işlemler uygulanmıştır. Çalışmada amino asit miktarları tek tek incelendiğinde mikrodalga uygulanan örneklerdeki arjinin miktarının ham örneğe göre daha fazla olduğu görülmüştür (76). Bizim çalışmamızda da mikrodalga uygulanan örneklerin protein miktarının fazla çıkması arjinin miktarının dolayısıyla absorbans değerinin fazla çıkmasıyla açıklanabilir. Diğer örneklerde ise protein miktarında azalma gözlenmiştir. Wang ve arkadaşlarının (2010) nohut ve kuru fasülyede yaptıkları bir çalışmada bu baklagillerin pişirilmesi sonucu protein miktarında azalma gözlenmiştir. Bunun sebebi ise pişirme sırasında çözülebilir katılarda yaşanan kayıplar olarak açıklanmıştır (77). Nohut kullanılan başka bir çalışmada ise pişirmenin toplam protein içeriğini %3,4 azalttığı, bunun sebebinin de proteinlerin pişirme suyuna geçişi olduğu bildirilmiştir (78).

Enzimatik hidroliz genellikle gıda kaynaklı protein hidrolizatları üretmek ve biyoaktif peptitlerin öncül proteinlerden salınımını sağlamak için kullanılır. Bizim çalışmamızda hidroliz verimi literatürdeki diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Hidroliz verimi ısıl işlemler ve fermantasyon ile artmıştır. Hidrolizatlardaki protein miktarı arasında istatistik olarak bir fark görülmemiştir. Hidroliz verimi en fazla kaynatılmış

örneklerde izlenmiştir. Termal prosesler, pişirmeden sonra proteinlerde konformasyonel değişiklik olduğundan, proteolitik enzimlerin etkisini artırmaktadır (79). Börülcenin çeşitleri ile yapılan çalışmalarda fırınlamadan sonra protein sindirilebilirliğinin yaklaşık % 85 arttığı bildirilmiştir (80, 81). Nohut kullanılan bir çalışmada in vitro protein sindirilebilirliği ısıtma işlemi sonucu artmıştır. Kaynatma sonucu meydana gelen artış istatistik olarak önemliyken, otoklav ve mikrodalga uygulanan örneklerdeki artış istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Sindirilebilirlikteki bu artışın protein denatürasyonu, tripsin inhibitörlerinin yıkımı veya taninler ve fitik asidin azalmasından dolayı olabileceği bildirilmiştir (82). Sorgum ile yapılan bir çalışmada ise fermentasyon sonucu in vitro protein sindirilebilirliği artmış ve sebebi tripsin inhibitörleri ve taninler gibi besleyici olmayan faktörlerin azalması olarak açıklanmıştır (83). Bilindiği gibi düşük protein sindirilebilirliğini besleyici olmayan faktörlerle ilişkilidir.

ADE inhibisyonunda en yüksek aktivite ultrason uygulanan örneklerde izlenmiştir. ADE inhibisyon aktivitesinde kontrole göre yaklaşık %14'lük bir artış olmuştur. Bu artış istatistik açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Literatür taraması sonuçları desteklemektedir. Buğday çimi kullanılan bir çalışmada ultrasonik ön işlemin ADE inhibitör aktivitesini %21-40,7 oranında artırdığı belirtilmiştir. Bunun sebebi amino asit konsantrasyonu ile açıklanmıştır. Ultrasonik ön işlem uygulanan örneklerde hidrofobik amino asit miktarının, özellikle prolin miktarının önemli derecede arttığı gösterilmiştir (84). Bu ultrasonik ön işlem gören hidrolizatların C-terminalinde prolin içeren peptit miktarının daha fazla olabileceğini kanıtlar niteliktedir. Bilindiği gibi C-terminalinde prolin içeren peptitler ADE inhibisyonu bakımından diğer peptitlere oranla daha yüksek aktivite göstermektedir. Prolin aynı zamanda bu peptitlerin stabilitesinde önemli rol oynamaktadır. Özellikle C-terminalinde bulunan prolin, genellikle ADE inhibitör peptitlere sindirim enzimleri tarafından parçalanmasına karşı direnç kazandırır (85).

Yine başka bir çalışmada ultrasonun ADE inhibitör peptitlerin üretimini artırdığı ve aktivitenin maksimuma ulaşması için geçen süreyi kısalttığı bildirilmiştir (86). Sonikasyon sırasındaki enzimatik hidrolizdeki artmanın kaviteasyon sebebiyle difüzyonun artışıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir. Zhou ve arkadaşları da (87), enzimatik hidrolizden önce ultrasonik ön işlemin ADE inhibitör aktivitesini artırdığını saptamışlardır.

Fermantasyon yıllardır süregelen bir gıda prosesidir. Fermantasyon hammaddede doğal olarak bulunan veya sonradan eklenen bir starter kültür yani mikroorganizma gerektirir. Bu mikroorganizmalar şekerleri ve proteinleri hidroliz ederek gelişirler. Bu hidroliz sırasında ise farklı amino asit dizilimine sahip peptitler ve serbest amino asitler oluşur. Proteoliz derecesi fermantasyonda kullanılan bakteri türüne ve fermantasyon koşullarına bağlıdır. Fermantasyon sonucunda ADE inhibitör aktivitesinde yaklaşık %31'lik bir azalış görülmüştür, fakat bu istatistik açıdan anlamlı bir azalış değildir ($p>0,05$). Bu sonuç literatürle tutarlılık göstermemektedir. Bunun kullanılan bakteri türünden veya fermantasyon koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çin'de geleneksel olarak üretilen fermente soya ürünü Douchi'nin fermantasyonu sırasında ADE inhibitör aktivitesinin değişiminin incelendiği bir çalışmada iki haftalık fermantasyon süresi boyunca aktivitenin arttığı ancak süre uzadıkça aktivitenin azalmaya başladığı görülmüştür. ADE inhibitör aktivitesine sahip peptitlerin, peptit hidrolizi gibi sebeplerle tüketiminin ADE inhibitör aktivitenin azalmasında etkili olabileceği bildirilmiştir (65).

Dört farklı *Enterococcus faecalis* türü ile yapılan bir çalışmada proteolitik aktiviteye sahip bakterilerin durağan faza geçene kadar ADE inhibitör aktivitenin arttığı bildirilmiş ve bunun proteoliz derecesiyle yakından ilgili olduğu belirtilmiştir. Fermantasyonun başlarında proteolizin arttığı, fermantasyonun ilk 6 saatinde ADE inhibitör aktivitesinde az miktarda artış olduğu, esas artışın ise 24 saatlik süreçte meydana geldiği ve 48 saat sonra aktivitede azalma görüldüğü kaydedilmiştir. ADE inhibitör aktivitenin proteoliz derecesi ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (88). Sütün farklı bakteri türleri ile fermente edilmesinden sonra ADE inhibitör aktivitesinin incelendiği bir çalışmada düşük hidroliz derecesinin düşük ADE inhibitör aktivitesiyle yakından ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu da farklı bakteri türleri arasındaki proteolitik sistemlerdeki farklılıklarla açıklanmıştır (89). Bu çalışmada kullanılan bakteri (*Lactobacillus plantarum*) fermantasyon süresiyle de orantılı olarak fazla proteolitik aktivite gösterip ADE inhibitör aktiviteye sahip peptitlerin de parçalanmasına sebep olmuş ve aktiviteyi azaltmış olabilir.

Kuru nohutun çiğ olarak tüketilmesinin mümkün olmadığı düşünülerek pişirilmiştir. Bunun sonucunda ADE inhibitör aktivitenin %18,6 azaldığı görülmüştür. Bu azalma istatistik olarak önemli değildir ($p>0,05$). Sıcaklık farklı materyallerde farklı etkilere

sebebi olabilmektedir. Kuru baklagillerle yapılan pek çok çalışmada ısı işlem ADE inhibisyon aktivitesinde artışa sebep olmuştur. Kuru fasulyeyle yapılan bir çalışmada 15 dakika kaynatılarak elde edilen hidrolizatların ısı işlem uygulanmayan hidrolizatlara göre daha yüksek ADE inhibitör aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir (90). Kuru fasulye, barbunya ve yeşil mercimeğin kullanıldığı bir diğer çalışmada 121°C’de 50 dakikalık ısı işlemin üç örnekte de ADE inhibitör aktivitesini artırdığı bulunmuştur (91).

Süt proteinlerinin ısıyla muamelesinin aminoasitlerin çapraz bağlanmasını ve rasemizasyonu indüklediği, böylece proteoliz hassasiyetinin de etkilenecek bu proteinlerden elde edilen ADE inhibitörü ve antihipertansif biyoaktif peptitlerin değişebileceği bildirilmiştir. Peptitlerdeki biyoaktif bölgelerin yapı değişikliği sonucu aktivite etkilenebilir (92).

ADE inhibitör peptitlerin aktivitesiyle yapısı arasındaki ilişki hala tam olarak bilinmemektedir. Fakat ADEnin bağlanması için en önemli faktörün C-terminal dizisi olduğu düşünülmektedir. C-terminaldeki lisin ve arjinin gibi pozitif yüklü amino asitlerin varlığı inhibitör potansiyelini artırabilir. Yüksek sıcaklıklardaki ısı işlem C-terminal dizisini değiştirebilir ve böylece ADE inhibitör aktivitesini etkileyebilir (49).

Yapılan bir çalışmada 65°C’de ısıtmanın peynir altı suyu proteinlerindeki kısmen açılmış konformasyonu indüklediği belirtilmiştir. Bu yapı önceden ulaşılmaz olan enzim aktif bölgesine enzimlerin ulaşımını sağlamıştır. Sıcaklık 90°C’ye ulaştığında ise agregatların oluştuğu ve bunların da enzimlerin aktivasyonunu azaltarak hidroliz derecesini etkilediği bildirilmiştir (93). Bizim çalışmamızda kullanılan sıcaklık derecesi yüksek olduğundan proteinlerde çözünmez yapılar meydana gelerek ADE inhibitör peptitlerin oluşmasını engellemiş olabilir.

Mikrodalganın protein yapısını etkilediği bilinmektedir. Mikrodalgalar elektromanyetik dalgalardır ve proteinlerin mikrodalga ile ısıtılması bipolar su moleküllerinin rotasyonu ile mikrodalga enerjisinin absorpsiyonu ve proteinlerin iyonik komponentlerinin dönüşümü ile sonuçlanır. Mikrodalga ile ısıtma protein hidrolizini hızlandırmak için kullanılmaktadır (94). Mikrodalganın termal ve termal olmayan olmak üzere iki tip etkisi vardır. Termal etkileri suyun veya organik kompleks

sistemlerin mikrodalga enerjiyi absorbe ederek oluşturduğu ısıyla ilgilidir. Termal olmayan etkiler tam olarak bilinemese de elektromanyetik alandan yapılarını değiştiren makromoleküllerin titreşimlerine aktarılan direk enerji ile ilgilidir (95).

Pramanik et al. (96) mikrodalga ile protein sindiriminin dakikalar içinde gerçekleştiğini fakat geleneksel yöntemler kullanıldığında saatler sürdüğünü bildirmiştir. Literatürde mikrodalga'nın biyoaktif peptitler üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Fakat aktivitede yaklaşık %4,5 oranında bir artış saptanmıştır. Bu artış istatistiki açıdan önemli değildir ($p>0,05$).

DPPH radikal süpürücü aktivite testinde, DPPH antioksidanlar tarafından radikal olmayan DPPH-H formuna dönüştürülür ve DPPH inhibisyonu ölçülür. Bu çalışmada en yüksek aktivite fermente edilmiş örneklerde gözlenmiştir (%10,3). Daha sonra sırasıyla pişirilmiş ve mikrodalga uyulanmış örneklerde görülmüştür. Ultrason ise antioksidan aktivitede azalmaya sebep olmuştur. Peptitlerin antioksidan özellikleri daha önce de belirtildiği gibi amino asit kompozisyonu, yapısı, hidrofobikliğiyle alakalıdır.

Literatürdeki çalışmalar fermente nohutlarda antioksidan aktivitenin arttığını kanıtlar niteliktedir. Soya sütünün *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces fragilis* ve *Leuconostoc crenoris* içeren kefir kültürü ile fermente edilmesinin fenolik bileşenleri artırdığı ve bunun da DPPH radikal süpürücü aktiviteyi artırdığı (97), *Bacillus subtilis* ile fermente edilen siyah soya fasulyesindeki aktivitenin fermente edilmeyene göre daha yüksek olduğu ve yine sebebinin fermente ürünlerin toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin daha fazla olması olarak açıklanabileceği (98) bildirilmiştir. Katı fazda fermente edilen nohutlarda fenoliklerin ve saponinlerin miktarı artmış böylece DPPH radikal süpürücü aktiviteleri de artmıştır (99).

Nohut protein hidrolizatlarının fraksiyonlarına ayrıldığı ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan fraksiyonun incelendiği bir çalışmada bu fraksiyonun aspartik asit, glutamin, histidin, tirozin ve arjinin içerdiği bildirilmiştir. Histidin ve tirozinin antioksidan aktivitede önemli yere sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada incelenen fraksiyonun yüksek antioksidan aktivite göstermesinin sebebi bu aminoasitlerin varlığıyla açıklanmıştır (100).

Nohutun fraksiyonlarına ayrıldığı başka bir çalışmada antioksidan aktivite gösteren fraksiyonların arjinin, fenilalanin, lösin, alanin ve aspartik asit bakımından zengin olduğu görülmüştür. En yüksek aktivite gösteren fraksiyonda toplam hidrofobik amino asit içeriği diğerlerine göre daha fazla bulunmuştur. Peptitlerde hidrofobisite arttıkça lipid içinde çözünübilirliği ve böylece antioksidan aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Peptitlerin antioksidan özellikleri ayrıca molekül ağırlıkları ile de ilgilidir. En yüksek aktivite gözlenen fraksiyondaki moleküler ağırlık 200-3000Da arasındadır. Literatürdeki diğer kaynaklar da yüksek antioksidan aktivitenin düşük moleküler ağırlık ile doğru orantılı olduğunu göstermektedir (101).

Ultrason uygulaması dışındaki diğer ısı işlemler antioksidan aktiviteyi artırmıştır. Isıl işlem görmüş tatlı mısırlarda artan toplam antioksidan aktivite hücre matriksinden bağlı fenoliklerin salınımının ve çözülebilir ferulik asit esterlerinin artmasıyla açıklanmıştır (102). Antioksidan ve DPPH arasındaki reaksiyonun antioksidanın yapısıyla ilgili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle termal prosesler fenoliklerin yapısını değiştirip antioksidan aktiviteyi artırmış olabilir. Ayrıca fitokimyasallarla termal olarak değişen fenoliklerin arasındaki sinerjetik etkiler aktiviteye katkı sağlamış olabilir (103).

Mikrodalga fırınlama yapılan arpalarda antioksidan aktivitenin arttığı belirtilmiştir. Bunun sebebi ise mikrodalga fırınlamanın melanoidler gibi çeşitli bileşenlerin üretilmesine yol açması olarak açıklanmıştır (104). Bu konuda literatürde fazla çalışma bulunmamaktadır.

5. BÖLÜM

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Günümüzde gıdalar sadece beslenmek için değil aynı zamanda fonksiyonel bir takım özelliklerinden faydalanmak için tüketilmeye başlanmıştır. Bu sebeple biyoaktif peptitler oldukça ilgi çekmektedir. Biyoaktif peptitlerin antimikrobiyel, antioksidan, antitrombotik, antihipertansif gibi pek çok faydalı aktivitesi bulunmaktadır.

Artan kardiyovasküler rahatsızlıklar bilim insanlarını bu konuda çalışma yapmaya zorlamıştır. ADE inhibitörü biyoaktif peptitler son zamanlarda ilgi odağı haline gelmiştir. Bu peptitlerle ilgili çalışmalar genellikle süt ve süt ürünleri ile et ve balıkta yoğunlaşmıştır. Kurubaklagiller ise yoğun protein içerikleri ve ulaşım kolaylığı göz önünde bulundurulduğunda araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bu materyallerle yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Nohut Türk mutfağında yer alan, zengin protein içeriğine sahip bir baklagildir. Bu çalışmada nohuta fermentasyon, ultrason, mikrodalga ve pişirme işlemleri uygulanarak tripsin ve pepsinle hidroliz edilmiş ve ADE inhibitör aktivitesi ile antioksidan aktivitesi ölçülmüştür.

Ultrason, ADE inhibitör aktiviteyi artırırken diğer ön işlemler kontrole göre aktivitede azalışa sebep olmuşlardır. Literatürle çelişen bu sonuca kullanılan materyalin farklı olması ve metotlardaki modifikasyonların sebep olabileceği düşünülmektedir.

DPPH radikal süpürücü aktivite en çok fermentasyonla artmıştır. Ultrason dışındaki diğer ısı işlemler de DPPH radikal süpürücü aktivitede artışa sebep olmuştur. Bu artışların prosesler sonucu oluşan hidrofobik amino asitlerle ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Öneriler:

Biyoaktif peptitler üzerine mikrodalga'nın etkilerini inceleyen çalışmalara literatür taramasında rastlanmamıştır. Mikrodalga uygulamasının biyoaktif peptitler üzerindeki etkilerinin daha detaylı incelendiği çalışmaların yapılmasının etkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada seçilen süre ve sıcaklıklar nohutun tüketilebilecek kadar piştiği, günlük kullanıma en uygun olabilecek noktalardır. Farklı sıcaklık ve süreler seçildiğinde sonuçlarda değişme olabileceği öngörülmektedir. Kaynatmanın farklı sürelerde ve sıcaklıklarda ADE inhibisyonunu artırdığı bilinmektedir. Bu nedenle değişik parametreler kullanılarak inceleme yapılmasının bilimsel açıdan yararlı olacağı düşünülmektedir.

Nohutun ADE inhibisyon ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmakla beraber, amino asit içeriğinin belirlenmesinin aktivitenin kaynağını anlamak bakımından faydalı olabileceği düşünülmektedir. Özellikle mikrodalga'nın antihipertansif ve antioksidan aktivite üzerine etkilerinin anlaşılması bakımından daha detaylı incelemelerin yapılması önemlidir.

Nohuttan protein izole edilerek in vitro aktivitesi kanıtlanmış örneklerin in vivo aktivitesinin araştırılması önerilmektedir.

Ultrasonik ön işlem uygulanmış nohutlardan endüstriyel anlamda biyoaktif peptit üretmek faydalı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Roy, F., Boye, J. I., Simpson, B. K., 2010. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. **Food Research International**, **43** (2): 432– 442.
2. Meisel H., Fitzgerald R.J., 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, **9**:1289-1295.
3. Lopez-Exposito I.L., Recio I.,2008. Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumour properties, pp.271–293. *In: Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 606 (Eds: Z. Bosze). Springer Science and Business Media, New York.
4. Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., Recio I., 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, **165**: 23–35.
5. Yoshiji, H., Kuriyama, S., Kawata, M., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Nakatani, T., Tsujinoue, H., Fukui, H., 2001. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor perindopril suppresses tumor growth and angiogenesis: possible role of the vascular endothelial growth factor. **Clinical Cancer Research**, **7** (4):1073–1078.
6. Fujita, H., Yoshikawa, M., 1999. LKPNM: a prodrug-type ACE inhibitory peptide derived from fish protein. **Immunopharmacology**, **44** (1-2): 123–127.
7. Moskowitz, D.W., Is “somatic” angiotensin I-converting enzyme a mechanosensor? **Diabetes Technology and Therapeutics**, **4**: 841–858.
8. Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R., 2003. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressurelowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* **77**: 326-330.
9. 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** : 1062 – 1071
10. FitzGerald, R.J., Meisel, H., 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. **British Journal of Nutrition**, **84**: 33–37.

11. Bech-Larsen, T., Grunert, K. G., 2003. The perceived healthiness of functional foods—A conjoint study of Danish, Finnish and American consumers' perception of functional foods. **Appetite**, **40**: 9–14.
12. Sloan, A. E., 2000. The top ten functional food trends. **Food Technology**, **54**: 33–62.
13. Sloan, A. E., 2002. The top 10 functional food trends: The next generation. **Food Technology**, **56**: 32–57.
14. Shahidi, F., Zhong, Y., 2008. Bioactive peptides. **Journal of AOAC International**, **91** (4): 932-935.
15. Erdmann, K., Cheung, B. W. Y., Schröder, H., 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, **19**: 643–654.
16. Hartmann, R., Meisel, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: From research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, **18**:163–9.
17. Kitts, D.D., Weiler, K., 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Desing**, **9**:1309–23.
18. Teschemacher, H., Koch, G., Brantl, V., 1997. Milk protein-derived opioid receptor ligands. **Biopolymers**, **43** (2): 99–117.
19. Holtt, V., 1983. Multiple endogenous opioid peptide. **Trends Neuroscience**, **6**: 24-26.
20. Sharma, S., Singh, R., Rana, S.,2011. Bioactive Peptides: A Review. **International Journal Bioautomation**, **15** (4): 223-250.
21. Chabance, B., Jolles, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L., Fiat, A.M., 1995. Characterization of an antithrombotic peptide from kappacasein in newborn plasma after milk ingestion. **British Journal of Nutrition**, **73** (4): 583–590.
22. Qian, Z.Y., Jolles, P., Migliore-Samour, D., Schoentgen, F., Fiat, A.M., 1995. Sheep kappa-casein peptides inhibit platelet aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta* ,1244 (2-3): 411–417.

23. Meisel, H., 1997. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. **Livestock Production Science**, **50** (1-2): 125- 138.
24. Potter, S.M., 1995. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. **Journal of Nutrition**, **125** (3): 606S–11S.
25. Hoskin, D.W., Ramamoorthy A., 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, **1778** (2):357–75.
26. Espitia, P.J.P., Soares, N.F.F., Coimbra, J.S.R., Andrade, N.J., Cruz, R.S., Medeiros, E.A.A., 2012. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. **Institute of Food Technologists**, DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00179.x.
27. Sarmadi, B.H., Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review, **Peptides**, **31** (10): 1949–1956
28. Wang, W.Y., De Mejia, E.G., 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, **4** (4): 63–78.
29. Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W.K., Je, J.Y., Kim, S.K., 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Research International**, **38** (2):175–182.
30. Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Nokihara, K., 1996. Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **44**: 2619–2623.
31. Altan N., Dinçel A.S., Koca C.,2006. Diabetes Mellitus ve oksidatif stres. **Türk Biyokimya Dergisi**, **31** (2): 51-56
32. Koca N., Karadeniz F., 2003. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. **Gıda Mühendisliği Dergisi**, **16**: 32-37
33. Şendur, M.A.N., Güven, G.S., 2011. Güncel kılavuzlar eşliğinde hipertansiyon tedavisi. **Hacettepe Tıp Dergisi**, **42**:53-64
34. <http://www.gihd.org/Default.aspx?Ctrl=Text&IDArticle=2>. (Erişim tarihi: Haziran 2013)

35. http://www.turkhipertansiyon.org/pdf/Turk_Hipertansiyon_Prevalans_Calismasi_Ozeti1.pdf. (Erişim tarihi: Mayıs 2013)
36. http://www.turkhipertansiyon.org/prevelans_calismasi_2.php. (Erişim tarihi: Mayıs 2013)
37. http://www.turkhipertansiyon.org/insidans_160608.php. (Erişim tarihi: Mayıs 2013)
38. Udenigwe, C.C., Aluko, R.E., 2012. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. **Journal of Food Science**, **71**(1): R11-R24
39. Wu, J., Aluko, R.E., Nakai, S., 2006. Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **54**:732–738.
40. Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W., 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **British Journal of Nutritional** **92**:357–366.
41. Matsufuji, H., Matsui, T., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M., Osajima, Y., 1994. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, **58** (12): 2244–2245.
42. Gardner, M.L., 1988. Gastrointestinal absorption of intact proteins. **Annual Review of Nutrition**, **8**:329–350.
43. Roberts, P.R., Burney, J.D., Black, K.W., Zaloga, G.P., 1999. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. **Digestion**, **60** (4): 332–337.
44. Rui, X., 2012. Assessment of the angiotensin i-converting enzyme (ace) inhibitory properties of bean protein hydrolysates. Department of Bioresource Engineering Macdonald Campus of McGill University, Doctora Thesis, Montreal, 176.
45. Pihlanto-Leppala, A., 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends in food science & technology**, **11**: 347-356.

46. Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T., 1996. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of Dairy Science**, **79**: 1316–1321.
47. Otte, J., Shalaby, S. M., Zakora, M., Pripp, A. H., El-Shabrawy, S. A., 2007. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. **International Dairy Journal**, **17** (5): 488–503.
48. Otte, J., Shalaby, S.M.A., Zakora, M., Nielsen, S.M., 2007. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from a-lactalbumin and b-casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. **International Dairy Journal**, **17** (12):1460–1472.
49. Lopez-Fandino, R., Otte, J., van Camp, J., 2006. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. **International Dairy Journal**, **16** (11):1277–1293
50. Thomas, T.D., Pritchard, G.G., 1987. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. **FEMS Microbiology Reviews**, **46** (3):245-268
51. Poolman, B., Kunji, E.R.S., Hagting, A., Juillard, V., Koning, W.N., 1995. The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. **Journal of Applied Bacteriology**, **24**: 65S-75S.
52. Masuda, O., Nakamura, Y., Takano T., 1996. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutrition**, **126** (12):3063-3068.
53. Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R., 2003. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure- lowering effect in hypertensive subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, **77** (2):326-330.
54. Jauhiainen, T., Vapaatalo, H., Poussa, T., Kyronpalo, S., Rasmussen, M., Korpela, R., 2005. *Lactobacillus helveticus* fermented milk lowers blood pressure in hypertensive subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement. **American Journal of Hypertension**, **18** (12): 1600-1605.

55. Dent, M.P., O'Hagan, S., Braun, W.H., Schaetti, P., Marburger, A., Vogel, O., 2007. A 90-day subchronic toxicity study and reproductive toxicity studies on ACE-inhibiting lactotripeptide. **Food and Chemical Toxicology**, **45** (8): 1468–1477.
56. Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., Sansawa, H., 2003. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing gammaaminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. **European Journal of Clinical Nutrition**, **57** (3): 490-495.
57. Chaves-López, C., Tofalo, R., Serio, A., Paparella, A., Sacchetti, G., Suzzi, G., 2012. Yeasts from Colombian Kumis as source of peptides with Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk. **International Journal of Food Microbiology**, **159**: (1) 39–46.
58. Otte, J., Lenhard, T., Flambard, B., Sørensen, K.I., 2011. Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. **International Dairy Journal**, **21** (4): 229-238.
59. Bernardini, R., Mullen, A.M., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Hayes, M., 2012. Assessment of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE-I) inhibitory and antioxidant activities of hydrolysates of bovine brisket sarcoplasmic proteins produced by papain and characterisation of associated bioactive peptidic fractions. **Meat Science**, **90** (1): 226–235.
60. Castellano, P., Aristoy, M.C., Sentandreu, M.A., Vignolo, G., Toldrá, F., 2013. Peptides with angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity generated from porcine skeletal muscle proteins by the action of meat-borne *Lactobacillus*. **Journal of Proteomics**, **89**: 183 – 190.
61. Barbana, C., Boye, J.I., 2011. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. **Food Chemistry**, **127** (1): 94–101.
62. Boye, J.I., Roufik, S., Pesta, N., Barbana, C., 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties and SDS-PAGE of red lentil protein hydrolysates. **LWT - Food Science and Technology**, **43** (6): 987–991.

63. Torino, M.I., Limón R.I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., Frias, J., 2013. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. **Food Chemistry**, **136** (2): 1030–1037.
64. Gibbs, B.F., Zougman, A., Masse, R., Mulligan, C., 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Research International**, **37** (2): 123–131.
65. Wang, H., Li, Y., Cheng, Y., Yin, L., Li, L., 2013. Effect of the Maillard reaction on angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity of douchi during fermentation. **Food and Bioprocess Technology**, **6** (1): 297-301.
66. Inoue, K., Gotou, T., Kitajima, H., Mizuno, S., Nakazawa, T., Yamamoto, N., 2009. Release of antihypertensive peptides in miso paste during its fermentation, by the addition of casein. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, **108** (2):111-115.
67. Siow, H.L., Gan, C.Y., 2013. Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. **Food Chemistry**, **141** (4): 3435-3442.
68. Barbana, C., Boye, J.I., 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. **Food Research International**, **43** (6): 1642–1649
69. Yust M.M., Pedroche, J., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Millan, F., Vioque, J., 2003. Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. **Food Chemistry**, **81** (3): 363–369.
70. Medina-Godoy, S., Ambriz-Perez, D.L., Fuentes-Gutierrez, C.I., German-Baez, L.J., Gutierrez-Dorado, R., Reyes-Moreno, C., Valdez-Ortiz, A., 2012. Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **92** (9): 1974–1981.
71. Fernandez-Orozco, R., Frias, J., Muñoz, R., Zielinski, H., Piskula, M. K., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C., 2007. Fermentation as a bio-process to obtain functional soybean flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **55** (22): 8972-8979.

72. 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
73. Sanchez-Moreno, C.A., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **6** (2): 270-276.
74. Sagdic, O., Silici, S., Ekici, L., 2013. Evaluation of the phenolic content and antiradical, antioxidant, antimicrobial activities of different floral sources of honey. **International Journal of Food Properties**, **16** (3): 658-666.
75. Mondor, M., Aksay, S., Drolet, H., Roufik, S., Farnworth, E., Boye, J.I., 2009. Influence of processing on composition and antinutritional factors of chickpea protein concentrates produced by isoelectric precipitation and ultrafiltration. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, **10** (3): 342–347.
76. Khattab, R.Y., Arntfield, S.D., Nyachoti, C.M., 2009. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments, Part 1: Protein quality evaluation. **LWT - Food Science and Technology**, **42**: 1107–1112.
77. Wang, N., Hatcher, D.W., Tyler, R.T., Toews, R., Gawalko, E.J., 2010. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **Food Research International**, **43**: 589–594.
78. Clemente, A., Sanchez-Vioque, R., Vioque, J., Bautista, J., Millan, F., 1998. Effect of cooking on protein quality of chickpea (*Cicer arietinum*) seeds. **Food Chemistry**, **62** (1): 1-6.
79. Rodrigues, M., Marques, Soares, R.A.M., Carlos, A.C.C., Siguemoto, E.S., Fontanari, G.G., Arêas, J.A.G., 2014. Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilization into micelles. **Food chemistry**, in press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.049>
80. Frota, K. M. G., Mendonca, S., Saldiva, P. H. N., Cruz, R. J., Areas, J. A. G., 2008. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. **Journal of Food Science**, **73** (9): H235-H240.
81. Avanza, M., Acevedo, B., Chaves, M., Anon, M., 2013. Nutritional and anti-nutritional components of four cowpea varieties under thermal treatments:

- Principal component analysis. **Lwt-Food Science and Technology**, **51**(1): 148-157.
82. Alajaji, S.A., El-Adawy, T.A., 2006. Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, **19**: 806–812.
 83. Osman, M.A., 2004. Changes in sorghum enzyme inhibitors, phytic acid, tannins and in vitro protein digestibility occurring during Khamir (local bread) fermentation. **Food Chemistry**, **88**: 129–134.
 84. Jia, J., Maa, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L., He, R., 2010. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein . **Food Chemistry**, **119** (1): 336–342
 85. Li, G. H., Le, G. W., Shi, Y. H., Shrestha, S., 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. **Nutrition Research**, **24**(7): 469–486.
 86. Madadlou, A., Sheehan, D., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, M.E., 2011. Ultrasound-assisted generation of ACE-inhibitory peptides from casein hydrolyzed with nanoencapsulated protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **91** (11): 2112–2116
 87. Zhou, C., Ma, H., Ding, Q., Lin, L., Yu, X., Luo, L., Dai, C., Yagoub, A.E.A., 2013. Ultrasonic pretreatment of corn gluten meal proteins and neutrase: Effect on protein conformation and preparation of ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitory peptides. **Food and Bioproducts Processing**, **91** (4): 665–671
 88. Quiros, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A., Recio, I., 2007. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. **International Dairy Journal**, **17**: 33-41
 89. Gonzalez-Gonzalez, C. R., Tuohy, K. M, Jauregi, P., 2011. Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. **International Dairy Journal**, **21**: 615-622.

90. Rui, X., Boye, J. I., Simpson, B. K., Prasher, S.O., 2012. Angiotensin I converting enzyme inhibitory properties of *Phaseolus vulgaris* bean hydrolysates: Effect of different thermal and enzymatic digestion treatments. **Food Research International**, **49** (2): 739-746.
91. Akıllıoğlu, H.G., 2009. Bazı Kurubaklagillerden Elde Edilen Protein Ekstraktları ve Fraksiyonlarının ADE İnhibisyon Aktiviteleri: Isıl İşlem ve *In Vitro* Sindirilirliğin Etkisi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 104 s.
92. Lopez-Fandino, R., Otte, J., van Camp, J., 2006. Physiological, chemical and technological aspects of milk protein derived peptides with antihypertensive and ACE inhibitory activity. **International Dairy Journal**, **16** (11): 1277-1293.
93. da Costa, E.L., da Rocha Gontijo, J.A., Netto, F.M., 2007. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, **17** (6): 632-640.
94. Izquierdo, F.J., Alli, I., Gómez, R., Ramaswamy, H.S., Yaylayan, V., 2005. Effects of high pressure and microwave on pronase and α -chymotrypsin hydrolysis of β -lactoglobulin. **Food Chemistry**, **92** (4): 713-719.
95. Porcelli, M., Cacciapuoti, G., Fusco, S., Massa, R., d'Ambrosio, G., Bertoldo, C., De Rosa, M., Zappia, V., 1997. Non-thermal effects of microwaves on proteins: thermophilic enzymes as model system. **FEBS Letters**, **402** (2-3): 102-106.
96. Pramanik, B.N., Mirza, U.A., Ing, Y.H., Liu, Y.H., Bartner, P.L., Weber, P.C., Bose, A.K., 2002. Microwave-enhanced enzyme reaction for protein mapping by mass spectrometry, a new approach to protein digestion in minutes. **Protein Science**, **11** (11): 2676-2687
97. McCue, P.P., Shetty, K., 2005. Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using Kefir cultures. **Process Biochemistry**, **40** (5): 1791-1797.
98. Juan, M. Y., Chou, C.C., 2010. Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. **Food Microbiology**, **27**(5): 586-591.

99. Xiao, Y., Xing, G., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M., Dong, M., 2014. Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18 . **Journal of Functional Foods**, **10**: 210–222
100. Zhang, T., Li, Y., Miao, M., Jiang, B., 2011. Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates. **Food Chemistry**, **128** (1): 28–33.
101. Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., Liu, J., 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). **Food Chemistry**, **106** (2): 444–450
102. Dewanto, V., Wu, X., Liu, R. H., 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **50**: 4959–4964.
103. Randhir, R., Kwon, Y., Shetty, K., 2008. Effect of thermal processing on phenolics, antioxidant activity and health-relevant functionality of select grain sprouts and seedlings. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** **9**: 355–364.
104. Baba, W.N., Rashid, I., Shah, A., Ahmad, M., Gani, A., Masoodi, F.A., Wani, I.A., Wani, S.M., 2014. Effect of microwave roasting on antioxidant and anticancerous activities of barley flour. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**. DOI: 10.1016/j.jssas.2014.06.003.

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Fadime Begüm OTAĞ

Uyruğu: T.C.

Doğum Yeri: SİVAS

Doğum Tarihi: 1989

Medeni Durumu: Bekâr

Mail Adresi: begumotag@gmail.com

Telefon: 0543 431 87 27

Yazışma Adresi: Kepenek Cad., No: 34/6

Merkez/SİVAS

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Fen Bilimler Enstitüsü / Kayseri	2014
Lisans	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği	2011
Lise	Sivas Fen Lisesi	2006

YABANCI DİL

İngilizce