

**FINDIK PROTEİN HİDROLİZATLARININ
ANTİHİPERTANSİF ETKİSİNİN
(ACE İNHİBİSYON AKTİVİTESİNİN)
BELİRLENMESİ**

EVREN ÇAĞLAR EROĞLU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANA BİLİM DALI**

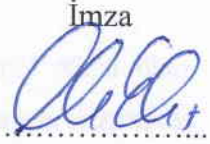
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Salih AKSAY**

**MERSİN
OCAK – 2016**

Evren Çağlar EROĞLU tarafından Yrd. Doç. Dr. Salih AKSAY danışmanlığında hazırlanan “Fındık Protein Hidrolizatlarının Antihipertansif Etkisinin (ACE İnhibisyon Aktivitesinin) Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ

İmza



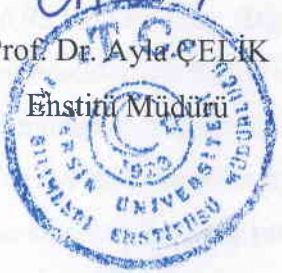
Yrd. Doç. Dr. Salih AKSAY



Yrd. Doç. Dr. Cemal KAYA



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21.../01./2016 tarih ve 2016-3...../135..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ayta ÇELİK
Enstitü Müdürü


Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

FINDIK PROTEİN HİDROLİZATLARININ ANTİHIPERTANSİF ETKİSİNİN (ACE İNHİBİSYON AKTİVİTESİNİN) BELİRLENMESİ

Evren ağlar EROĞLU

ÖZ

Biyoaktif peptitler, insan sağlığı üzerinde birçok fonksiyonel etkisi olan önemli protein kaynaklarıdır. Genelde bitkisel ve hayvansal gıda ürünlerinin enzimatik hidroliziyle üretilen biyoaktif peptitler amino asit dizilimine bağlı olarak kan basıncını düşürme, bağışıklık sistemini güçlendirme, antimikrobiyal etki, antioksidan aktivite, kolesterolü düşürme, mineral bağlama, safra asitlerini bağlama ve tansiyonu düşürme gibi biyoaktif özelliklere sahiptirler.

Bu tezde yağı alınıp, izoelektrik çöktürme yöntemiyle saflaştırılmış fındık protein konsantresi, pepsin ve tripsin enzimleriyle 120 dakika hidroliz edilmiş ve hidroliz işleminin 0, 30, 60 ve 120 dakikalarında örnekler alınarak yüksek tansiyondan (hipertansiyon) sorumlu bir enzim olan Anjiyotensin Dönüştürücü Enzimi (ACE) inhibe edebilme değerleri incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre pepsin hidrolizinin 0, 30, 60 ve 120. dakikalarında alınan hidrolizat örneklerinin yüzde ACE inhibisyon değerleri (%İNH) sırasıyla %98,54, %98,68, %98,24 ve %96,93 bulunmuştur. Tripsin hidrolizinin 0, 30, 60 ve 120. dakikalarında alınan hidrolizat örneklerinin %İNH değerleri ise sırasıyla %80,10, %96,29, %92,10 ve %92,54 bulunmuştur. Pepsin hidrolizinin 0, 30, 60 ve 120. dakikalarında alınan örneklerin ACE'yi %50 oranında inhibe edebilen protein miktarı (IC50 değerleri) incelendiğinde ise sırasıyla 1,47 mg protein/ml, 0,27 mg protein/ml, 0,27 mg protein/ml ve 0,26 mg protein/ml bulunmuştur. Tripsin hidrolizinin 0, 30, 60 ve 120. dakikalarında alınan örneklerin IC50 değerleri ise sırasıyla 5,51 mg protein/ml, 0,61mg protein/ml, 0,56 mg protein/ml ve 0,54 mg protein/ml bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Fındık, Protein Hidrolizatı, Pepsin Hidrolizi, Tripsin Hidrolizi, ACE İnhibisyon Aktivitesi, Antihipertansif Etki

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Salih AKSAY, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mersin Üniversitesi

DETERMINATION OF ANTIHYPERTENSIVE EFFECT (ACE INHIBITORY ACTIVITY) OF HAZELNUT PROTEIN HYDROLYSATES

Evren ağlar EROĞLU

ABSTRACT

Bioactive peptides are important source of protein with many functional effects on human health. They are generally produced with hydrolysis of plant and animal based food products. Depending on the amino acid sequence, they have some bioactive properties such as lowering blood pressure, strengthening the immune system, antimicrobial effect, antioxidant effect, cholesterol lowering, mineral binding and antihypertensive effect

In this thesis, hazelnut protein isolate, concentrated with isoelectric precipitation method, is hydrolysed using pepsin and trypsin enzyme for 120 minutes and during the hydrolysis. Samples are taken at 0, 30, 60 120 minutes to analyse angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity.

According to these results, percent ACE inhibitory activities (%INH) of hydrolysates at 0, 30, 60 and 120 min of pepsin hydrolysis are respectively 98.54%, 98.68%, 98.24% and 96.93%. %INH of hydrolysates at 0, 30, 60 and 120 min of trypsin hydrolysis have been found respectively 80.10%, 96.29%, 92.10% and 92.54%. As regards to IC50 value for ACE inhibitory activity, samples taken at 0, 30, 60 and 120 minutes of pepsin hydrolysis have IC50 values respectively of 1.47 mg protein/ml, 0.27 mg protein/mL, 0.27 mg protein/mL and 0.26 mg protein/mL. IC50 of the trypsin hydrolysates at 0, 30, 60 and 120 minutes are respectively measured 5.51 mg protein/mL, 0.61 mg protein/mL, 0.56 mg protein/mL and 0.54 mg protein/mL

Key Words: Hazelnut, Protein Hydrolysate, Pepsin Hydrolysis, Trypsin Hydrolysis ACE Inhibitory Activity, Antihypertensive Effect,

Advisor: Asst. Prof. Dr. Salih AKSAY, Department of Food Engineering, University of Mersin

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren, araştırma konumun tüm detayları ile ele alınmasını, düzenlenmesini, değerlendirilmesini sağlayan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Salih AKSAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde ihtiyaç duyduğum imkanları sunan Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümüne ve Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezimin her aşamasında, ihtiyaç duyduğum her konuda destek veren ve ALATA Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü'nün imkanlarından faydalanmamı sağlayan Enstitü Müdürümüz Sayın Dr. Davut KELEŐ'e teşekkür ediyorum.

Çalışmam boyunca bana sağladıkları motivasyon ve desteklerinden dolayı başta ALATA Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Hasat Sonrası Fizyolojisi Bölüm Başkanı Mustafa ÜNLÜ olmak üzere tüm mesai arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan annem, babam ve kardeşlerime, tanıştığımız ilk günden itibaren başarılarımla birlikte her türlü zor zamanıma da ortak olan, bana sonsuz sabır ve güven gösteren sevgili eşim Şenay'a ve hayatımıza girdiği andan itibaren mutlulukların en büyüğünü yaşatan biricik fıstığım, kızım Zeynep'e sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|---|-------------|
| ÖZ | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vii |
| SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| | |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| | |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI | 2 |
| | |
| 2.1. FONKSİYONEL GIDALAR | 2 |
| 2.1.1 Fonksiyonel Gıdanın Tanımı..... | 2 |
| 2.1.2 Fonksiyonel Gıdalar ve Nütrasötikler..... | 3 |
| 2.2. FINDIK..... | 4 |
| 2.2.1. Fındığın Fizikokimyasal Özellikleri..... | 6 |
| 2.2.2. Fındığın Biyoaktif Özellikleri..... | 9 |
| 2.3. PROTEİNLERİN HİDROLİZİ..... | 9 |
| 2.4. BİYOAKTİF PEPTİTLER..... | 12 |
| 2.5 BİYOAKTİF PEPTİTLER VE KARDİYOVASKÜLER SAĞLIK..... | 14 |
| 2.5.1. Antihipertansif peptitler..... | 15 |
| 2.5.2. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) ve ACE İnhibitörleri..... | 17 |
| | |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM | 21 |
| | |
| 3.1. MATERYAL..... | 21 |
| 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasalları..... | 22 |
| 3.2. YÖNTEM..... | 22 |
| 3.2.1. Protein Analizi..... | 22 |
| 3.2.2. Protein hidrolizi..... | 23 |
| 3.2.3. ACE inhibisyon Analizi..... | 25 |
| 3.2.3.1. HHL Hidrolizi ve Enzim İnhibisyonu..... | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.3.2. HPLC Okuması..... | 26 |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA..... | 29 |
| 4.1. BULGULAR..... | 29 |
| 4.1.1. Farklı Hidroliz Zamanlarında Alınan Örneklerin ACE İnhibisyon Değerleri... 29 | |
| 4.1.1.1. Farklı Zamanlardaki Pepsin hidrolizatlarının %İNH Değerleri..... | 29 |
| 4.1.1.2 Farklı Zamanlardaki Tripsin hidrolizatlarının %İNH Değerleri..... | 30 |
| 4.1.2 Pepsin ve Tripsin Hidrolizatlarının IC50 Değerlerinin Bulunması..... | 31 |
| 4.1.2.1. Pepsin Hidrolizatlarının IC50 Değerlerinin Bulunması..... | 31 |
| 4.1.2.2. Tripsin Hidrolizatlarının IC50 Değerlerinin Bulunması..... | 35 |
| 4.2 TARTIŞMA | 38 |
| 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER..... | 42 |
| KAYNAKLAR..... | 43 |
| ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ..... | 53 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| Çizelge 2.1.Yaşam Tarzı ve Hastalıklar..... | 2 |
| Çizelge 2.2. Dünya Fındık Üretimi..... | 5 |
| Çizelge 2.3. Fındık Küşesi Analiz Sonuçları..... | 9 |
| Çizelge 2.4. Gıdalardan Üretilen Bazı Biyoaktif Peptit Örnekleri..... | 13 |
| Çizelge 2.5. Bazı ACE İnhibitörü Peptitler..... | 19 |
| Çizelge 3.1. İnhibitör, Kontrol Ve Kör Örneklerinin İçerikleri..... | 27 |
| Çizelge 4.1. Pepsin Hidrolizi %İNH ve Protein İçeriği Değerleri..... | 32 |
| Çizelge 4.2. Pepsin Hidrolizatlarının IC50 Değerleri..... | 35 |
| Çizelge 4.3. Tripsin Hidrolizi %İNH ve Protein İçeriği Değerleri | 36 |
| Çizelge 4.4. Tripsin Hidrolizatlarının IC50 Değerleri..... | 38 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| Şekil 2.1 Protein Hidrolizi..... | 10 |
| Şekil 2.2. Peptitlerin Farklı Peptidazlarla Hidrolizi | 11 |
| Şekil 2.3. Anjiyotensinojenin Anjiyotensin I'ye Dönüşümü..... | 17 |
| Şekil 3.1. Protein Analizi..... | 23 |
| Şekil 3.2. Pepsin ve Tripsin Protein Hidrolizi Akım Şeması..... | 24 |
| Şekil 3.3. Örneklerin HA oluşumu üzerine etkileri..... | 25 |
| Şekil 3.4. Hipürik Asit Kalibrasyon Grafiği..... | 27 |
| Şekil 3.5. HA ve HHL'ye ait HPLC kromatogramı | 28 |
| Şekil 4.1. Pepsin Hidrolizatlarının %ACE İnhibisyon Değerleri..... | 30 |
| Şekil 4.2. Tripsin Hidrolizatlarının %ACE İnhibisyon Değerleri..... | 30 |
| Şekil 4.3. Pepsin hidrolizatlarının protein içeriklerine karşılık %İNH değerleri..... | 33 |
| Şekil 4.4. Pepsin Hidrolizi Sırasında IC50 Değerindeki Değişim..... | 34 |
| Şekil 4.5. Tripsin hidrolizatlarının protein içeriklerine karşılık %İNH değerleri..... | 36 |
| Şekil 4.6. Tripsin Hidrolizi Sırasında IC50 Değerindeki Değişim..... | 38 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|------|---|
| ACE | : Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim |
| HHL | : N-Hippuril-Histidin-Lösın Hidratı |
| HA | : Hippürik Asit |
| P0 | : Pepsin Hidrolizini Öncesinde Alınan Kontrol Örneği |
| P30 | : Pepsin Hidrolizinin 30. dakikasında Alınan Örnek |
| P60 | : Pepsin Hidrolizinin 60.dakikasında Alınan Örnek |
| P120 | : Pepsin Hidrolizinin 120.dakikadasında Alınan Örnek |
| T0 | : Tripsin Hidrolizini Öncesinde Alınan Kontrol Örneği |
| T30 | : Tripsin Hidrolizinin 30.dakikasında Alınan Örnek |
| T60 | : Tripsin Hidrolizinin 60.dakikasında Alınan Örnek |
| T120 | : Tripsin Hidrolizinin 120.dakikasında Alınan Örnek |
| %İNH | : %ACE inhibisyon değeri |
| IC50 | : ACE'yi %50 oranında inhibe edebilen protein miktarı |

1. GİRİŞ

Son yıllarda insan sağlığı için faydalı, fonksiyonel özelliği olan gıda tüketme anlayışı giderek önem kazanmıştır. Bu kapsamda değerlendirilen biyoaktif peptitler antioksidan aktiviteleri, kalsiyum tutma güçleri, Tip 2 diyabet önleme potansiyelleri gibi fonksiyonel özellikleri bakımından birçok araştırmaya konu olmuştur ve olmaya devam etmektedir. Bu fonksiyonel özelliklerden en önemlilerinden biri de antihipertansif (ACE inhibisyon aktivitesi) özelliğidir.

Süt ve süt ürünlerinden soya, bezelye, mercimek gibi bitkisel proteinlere, alglerden deniz ürünleri atıklarına kadar birçok ürünün ACE inhibisyon etkisi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmaların bazılarında bu kaynaklardan elde edilen proteinler tripsin, pepsin, kimotripsin, alkalaz gibi farklı proteolitik enzimlerle hidroliz edilerek proteinin inhibisyon etkisi artırılmaya çalışılmıştır.

Dünyada üretimini en fazla Türkiye’de gerçekleşen ve protein içeriği yüksek olan fındığın insan sağlığı üzerine olumlu etkileri bilinmektedir. Bu yüksek protein oranına rağmen fındık proteininin ACE inhibisyon kapasitesi üzerine fazla çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada farklı enzimler kullanılarak elde edilen fındık protein hidrolizatlarının ACE inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında yaklaşık % 90 saflıkta fındık proteini izolatu tripsin ve pepsin enzimleriyle hidroliz edilmiş ve oluşan hidrolizatın antihipertansif etkileri sıvı kromatografik yöntemle incelenmiştir. Çalışma sonunda düşük kalite fındıkların ve fındık yağı üretimi sonrası ortaya çıkan proteince zengin atık/yan ürünlerin değerlendirilebilme potansiyeli de ortaya çıkarılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1 FONKSİYONEL GIDALAR

Günümüzde tüm gelişmiş ülkelerde yeni teknolojilerin gelişmesi sonucu yeni yaşam tarzı ve daha uzun ömür beklentileri, tedavi masraflarının aşırı düzeyde artışına ve buna bağlı olarak farklı tüketim alışkanlıklarının edinilmesine neden olmuştur [Boyacıoğlu, 2004].

Ülkeler ve toplumlar artık yaşam sürelerini ve kalitelerini artırmak için sağlık sorunlarını tedavi ettirmek yerine önleyici tedbirler almayı tercih etmektedirler. Beslenme şekli ve tercihi bu önleyici tedbirlerin en başında gelmektedir. Beslenirken aynı zamanda da iyi hali koruyan, geliştiren ve hastalık oluşma riskini azaltan fonksiyonel gıdalar artık daha fazla tercih edilmektedir [Erbaş, 2006]. Gıda Biliminin gelişmesine paralel olarak artan sağlıklı ve fonksiyonel gıda tüketimi isteği bir taraftan günlük diyeti zenginleştirecek yeni besin arayışlarına hız kazandırırken diğer taraftan hastalıkların tedavisinde alternatif ve doğal yöntemler gelişmesine neden olmaktadır [Boyacıoğlu, 2004]. Çizelge 2.1'de Kanada'da 2006 yılında yapılan bir çalışmada yaşam tarzı ile ilişkili olabilecek hastalıklar ve tedavi masrafları gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Yaşam Tarzı ve Hastalıklar [Holub, 2006]

| Kanada da Yaşam tarzı ile ilişkili olabilecek hastalıklar ve tedavi masrafları | |
|---|-----------------|
| Kalp Hastalıkları | 13 milyar dolar |
| Diyabet | 10 milyar dolar |
| Kanser | 20 milyar dolar |
| İltihaplanma ve türevi hastalıklar | 13 milyar dolar |
| Günlük diyet ile ilişkili düzensizlikler | 13 milyar dolar |

2.1.1 Fonksiyonel Gıdanın Tanımı

Fonksiyonel gıdalar, temel besin değeri yanında insan sağlığını destekleyen, günlük diyet ile gıda formunda tüketilebilen, sentetik bileşen içermeyen, besleyici

etkisinin yanında, değişik etkenlerle hastalık oluşma riskini azaltan, sağlığı ve iyi hali geliştirici özelliklere sahip gıdalardır. Gıdanın fonksiyonel olabilmesi için biyoaktif bileşikler, probiyotik mikroorganizmalar ve probiyotik maddeler gibi etkenlere sahip olması ve bu etkenlerin vücudun ilgili bölgesine yeterince gönderilebilmesi gereklidir [Erbaş, 2006, Sanders, 1998]

Her ne kadar fonksiyonel gıdaların belirlenmiş net bir tanımı olmasa da Amerikan Diyetetik Kurumunun “bütün, zenginleştirilmiş, takviye edilmiş, güçlendirilmiş ya da geliştirilmiş olabilen fakat daha önemlisi günlük diyetin bir parçası olarak kullanılırken tüketicilerin sağlığına potansiyel olarak fayda sağlayacak gıdalardır” tanımı genel olarak kabul görmektedir [ADA, 1999]

2.1.2 Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasötikler

Fonksiyonel gıdalar ile nutrasötikler genellikle birbiri ile karıştırılmaktadır. Fonksiyonel gıdaların çoğu geleneksel gıdalar olup birtakım fizyolojik faydaları bulunurken, nutrasötikler gıdalardan elde edilmiş ve genellikle kapsül vs. şeklinde ilaç formundaki doğal sağlık ürünleri olarak satışa sunulmaktadır. Fonksiyonel gıdalar ve nutrasötiklerin sağlığa olumlu etkileri, hastalık önleme özellikleri ortaktır. [Shahidi, 2009].

Gıda olarak tanımlanamayacak fakat gıdalardan elde edilmiş, genellikle ilaç formunda satışa sunulmuş ve içeriğinde konsantre edilmiş bir veya birden fazla biyoaktif madde olan katkı maddelerine ise nutrasötik denilmektedir. [Hasler, 2002]

Fonksiyonel gıdalar ve nutrasötiklerin son yıllarda önem kazanmasının nedeni insan sağlığını desteklemesi, hastalık riskini ve hastalık masraflarını azaltmasıdır. Fonksiyonel gıdalar tam buğday gibi işlem görmemiş halde olabileceği gibi sadece buğday kabuğu ya da işlem görmüş bir yan ürün de olabilir. Fakat çoğu durumda gıda işlemleri fonksiyonel gıdalar ve nutrasötiklerin bioaktif özelliklerini negatif etkilemektedir. Dolayısıyla minimal işlem görmüş gıdalar tüketiciler tarafından daha fazla tercih edilmektedir. Fonksiyonel gıdalar ve nutrasötiklerin kısa

vadede sağlığı olumlu olarak desteklemekle birlikte uzun vadede ömrü uzatma gibi özellikleri de bulunmaktadır [Shahidi, 2009].

2.2 FINDIK

Fındık bitkisi, ılıman iklim bölgelerinin bodur kalmış bir ağaç türüdür. Fagales takımının Betulaceae familyasının Coryleae alt familyasının, *Corylus* cinsinden olan fındığın ekonomik olarak kültürü yapılan türleri *Corylus avellane* (adi fındık), *Corylus colurna L.* (Türk fındığı) ve *Corylus maxima mill'*dir (Lambert fındığı). Ayrıca günümüzde çeşitli türlerin melezleri de oldukça önem kazanmıştır. Fındıklar meyve iriliklerine ve şekillerine göre isimlendirilir. Ülkemizde tombul fındık, sivri fındık, badem fındık, kan fındığı ve foşa fındığı başlıca fındık çeşitleridir. Bunun haricinde Acı, Cavcava, Çakıldak, Foşa, Ham, İncekara, Kalınkara, Kan, Karafındık, Kargalak, Kuş, Mincane, Palaz, Sivri, Tombul, Uzun Musa, Yassı Badem, Yuvarlak Badem Türkiye'de yetişen diğer önemli çeşitlerdir [Pelvan vd., 2012]. Bu çeşitler arasında Tombul çeşidi Türkiye toplam üretimin % 25–30'ini kapsamaktadır [Gönşüoğlu ve Gökmen, 2015].

M.Ö. IV. Yüzyılda Çin'den Giresun'a geldiği rivayet edilen fındık bu yörede en uygun ekolojik ortamını yakalamış ve tüm dünyaca kabul edilen kaliteye ulaşmıştır [Deniz, 2009]. Türkiye'de, 2010 yılı itibariyle 660 bin hektar alanda dünya üretimin %76'sı gerçekleştirilmiştir. 2005-2007 döneminde 230 bin ton iç fındık ihracatı ile dünya fındık ihracatının %85,13'ü gerçekleştirilmiştir [Kayalak ve Özçelik, 2012]. Çoğunluğu yurtdışı pazarına gönderilen fındık, Türkiye toplam ihracatının %2'sini oluştururken sadece tarım ürünleri düşünöldüğünde bu oran %18'e yükselmektedir [Kızıltan ve Yalçın, 2010]. Dünya fındık üretimde Türkiye'yi %16 ile İtalya, %4 ile ABD ve %3 ile İspanya takip etmektedir [Seyhan vd., 2007]. Almanya, 1970 ile 2010 yılları arasında en çok fındık ithalatı yapan ülkedir. Almanya 2000 yılında 68 bin ton, 2010 yılında yaklaşık 64,1 bin ton, İtalya ise 2000 yılında 12,8 bin ton, 2010 yılında 17,2 bin ton net fındık ithalatı yapmıştır. Belçika, Fransa, İsviçre, Kanada, Rusya Federasyonu ve Brezilya diğer önemli fındık ithalatçılarıdır. [Akseki, 2014]

Fındık, ülkemizin 39 ilinde üretilmektedir. Ticari değeri yüksek olan fındık Giresun, Ordu, Trabzon illerinde tek tarım tipi (monokültür) olarak yapılmaktadır. Üretilen fındıkların Türkiye bölgesel rekolte ortalamasına bakıldığında Akçakoca Bölgesi'nin % 36,2'lik ortalamayla ilk sırada olduğu onu % 34,8'lik ortalamayla Ordu Bölgesinin izlediği görülmektedir. Daha sonra %17,4 ile Giresun ve %11,6 ile Trabzon gelmektedir [Kızıltan ve Yalçın, 2010]. Fındık yetiştiriciliği aile işletmeciliği şeklinde yapılmaktadır. Fındık Türkiye'de 400.000 işletmecinin geçim kaynağıdır [Kızıltan ve Yalçın, 2010]. Tarımsal ürün ihracatımızda yaklaşık % 15- 20'lik payı olan fındığın en önemli özelliklerinden birisi, ülkemize getirdiği döviz girdisinin tamamını milli kaynaklardan sağlamasıdır [GTB, 2015]

Fındık bademden sonra dünyada en yaygın yetiştiriciliği yapılan sert kabuklu meyvedir. Türkiye dışında İtalya, İspanya, ABD, Gürcistan, Azerbaycan, Çin, İran, Şili, Avustralya ve Fransa'da yetiştirilmektedir. Bu ülkelerin yanı sıra Polonya, Yunanistan, Belarus, Hırvatistan, Tacikistan, Özbekistan, Rusya Federasyonu, Kırgızistan, Portekiz, Beyaz Rusya, Moldova, Tacikistan, Ukrayna, Tunus, Slovenya, Slovakya, Moldova, Suriye, Kıbrıs, Arjantin, Avusturya, Estonya, Yeni Zelanda, Romanya ve Kamerun gibi ülkelerde de az da olsa fındık üretilmekte ve üretimin artırılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Dünya fındık üretimi, 1960'lı yıllarda yaklaşık 250 bin ton civarında iken, son yıllarda bir milyon tona yaklaşmıştır [GTB, 2015]. Çizelge 2.2.'de Dünya Fındık üretimin incelendiği çalışmada en fazla üretim yapan ülkeler ve yıllara göre üretim miktarlarındaki değişim görülmektedir.

Çizelge 2.2. Dünya Fındık Üretimi [GTB, 2015].

| DÜNYA FINDIK ÜRETİMİ (TON) | | | | | | | | |
|----------------------------|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ÜLKELER | 2007/08 | 2008/09 | 2009/10 | 2010/11 | 2011/12 | 2012/13 | 2013/14 | 2014/15 |
| TÜRKİYE* | 530.000 | 800.791 | 500.000 | 600.000 | 430.000 | 660.000 | 549.000 | 412.000 |
| İTALYA | 115.000 | 125.000 | 120.000 | 107.000 | 140.000 | 84.000 | 132.000 | 100.000 |
| A.B.D. | 33.570 | 36.280 | 42.600 | 24.500 | 35.000 | 32.000 | 35.000 | 36.300 |
| AZERBAYCAN | 30.800 | 40.000 | 35.000 | 39.000 | 55.000 | 40.000 | 30.000 | 25.000 |
| GÜRCİSTAN | 25.000 | 35.000 | 32.000 | 40.000 | 30.000 | 28.000 | 35.000 | 35.000 |
| İSPANYA | 23.000 | 26.000 | 18.000 | 20.000 | 22.000 | 16.000 | 19.500 | 19.500 |
| DİĞER | 57.880 | 6.729 | 27.000 | 27.000 | 27.000 | 25.000 | 25.000 | 25.000 |
| TOPLAM | 815.250 | 1.069.800 | 774.600 | 857.500 | 739.000 | 885.000 | 825.500 | 660.773 |

Türkiye dünyada en fazla fındık üretimini gerçekleştiren ülke olmasına rağmen verimlilikte ancak 3.sıradadır. Dünyada fındık üretiminde dekara verimlilikte ilk sırada ABD gelmekte, onu ikinci sırada İtalya izlemektedir [Kızıltan ve Yalçın, 2010]. Ülkemizde arzda dalgalanmalara bağlı olarak fiyatta meydana gelen istikrarsızlık nedeniyle oluşan güvensizlik sonucunda önemli alıcı firmalar Arjantin ve Şili gibi ülkelerde fındık üretimi yapılması için özendirici ve teşvik edici faaliyetlerde bulunmaktadır. Fındık üretiminde adı geçen ülkelerin fındık ihraç edebilecek konuma geldiği, fındık üretim alanlarının toplam büyüklüğünün 10.000 ha seviyelerinde olduğu tahmin edilmektedir [GTB, 2015].

Çerezlik olarak tüketilmesi yanında hammadde olarak kullanıldığı için fındığın hangi ürünlerde ne kadar tüketildiğine ilişkin sağlıklı verilere ulaşmak mümkün olmamaktadır. Yapılan bir araştırmada iç fındığın %80'inin çikolata sanayisinde, %15'inin şekerleme, bisküvi ve pasta sanayisinde ve %5'inin de herhangi bir işleme tabi tutulmadan tüketildiği belirtilmiştir [Köksal vd., 2006].

Ülkemizde yılda 80 bin ton civarında fındık tüketilmektedir. Antep fıstığı, badem, ceviz ve kestane gibi ikame ürünlerin çok olması, tüketimi artırmaya yönelik çalışmaların yetersizliği, fındığın kullanım alanlarının yaygınlaştırılmaması, halkın alım gücünün yetersizliği gibi birçok faktörler iç fındık tüketiminin artışıını olumsuz yönde etkilemektedir. Günümüzde üretilen fındığın sadece % 11-12'lik kısmı iç pazarda tüketilmekte ve kişi başına yıllık tüketim miktarı 500–600 gr civarında kalmaktadır. Bu nedenle fındık, bölge ekonomisinin temel unsuru olmakla aynı zamanda sosyolojik olarak da ele alınması gereken bir üründür [GTB, 2015].

2.2.1 Fındığın Fizikokimyasal Özellikleri

İnsan beslenmesinde önemli bir yeri olan fındık, çeşitli şekillerde tüketilmekle birlikte iç fındığın büyük bir kısmı kabuksuz olarak gıda sanayisinde kullanılmaktadır. Fındık organoleptik özellikleri nedeniyle pasta ve çikolata sanayinde özellikle önemlidir. Ayrıca lezzet ve aroma katkı maddesi olarak fırıncılık, süt endüstrisi, salata ve sos sektöründe de kullanılmaktadır [Özdemir ve Akıncı, 2004].

Fındık aroma ve lezzet özellikleri dışında içerdiği zengin protein, yağ, vitamin ve mineral içeriği nedeniyle insan beslenmesi ve insan sağlığı açısından da önemlidir. [Özdemir ve Akıncı, 2004; Alasalvar vd., 2003]

Fındık bütün kabuklu yemişler arasında en iyi E vitamini kaynaklarından birisidir. Ayrıca doğal antioksidan içeriği çok fazladır ve bu özelliği nedeniyle kanser, ateroskleroz ve diyabet hastalıklarını önleme potansiyeline sahiptir. Fındığın fiber içeriği besin değerini daha da artırmaktadır. Bu nedenle başta diyabet, hiperlipitemi ve obezite olmak üzere çeşitli hastalıklara olumlu etkisi vardır [Alasalvar vd., 2003].

Besin içeriği ve kompozisyonu fındığın yetiştirme yeri, zamanı ve fındık çeşidine göre değişiklik göstermektedir [Özdemir vd.,2001]. İç fındık yağ ve proteinler bakımından önemli bir besin maddesidir. Fındığın protein miktarının, yumurta ve tahıllardan daha yüksek olduğu et ve kuru baklagillerin içerdiği miktara da hemen hemen eşit olduğu belirtilmektedir. Farklı fındık çeşitlerindeki toplam protein içeriği %17,4-20,8, yağ içeriğinin ise %56,07-68,52 arasında olduğu anlaşılmıştır [Köksal vd., 2006].

Fındığın en önemli bileşen ögesi yağdır. Fındıktaki yağ miktarı %63,6 olarak bulunmuştur. Bu toplam yağ miktarının büyük bir kısmı doymamış yağ asididir. Oleik asit %71.37 değeri ile en yüksek oranda bulunan yağ asididir. Oleik asidi sırasıyla %7,77, %4,52 ve %1,99 değerleri ile linoleik, palmitik ve stearik asit izlemektedir [Özdemir vd., 1998]. Karadeniz de yetişen 17 farklı fındık çeşidinin bileşenlerinin incelendiği başka bir çalışmada temel yağ asitlerinin %79,4 ile oleik asit, %13,0 ile linoleik asit ve %5,4 palmitik asit olduğu anlaşılmıştır. Çoklu doymamış/doymuş yağ asidi ve doymamış/doymuş yağ asitleri oranı sırasıyla 1,23-2,87 ve 11,1-16,4 aralığında bulunmuştur. Ortalama niasin, vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, askorbik asit, folik asit, retinol ve toplam tokoperol içeriği sırasıyla 1,45 mg/100 g, 0,28 mg/100 g, 0,05 mg/100 g, 0,5 mg/100 g, 2,45 mg/100 g, 0,043 mg/100 g, 3,25 mg/100 g ve 26,9 mg/ 100 g bulunmuştur. Esansiyel amino asitler arjinin (2003 mg/100 g) ve lösin (1150 mg/100 g) bulunmuşken, esansiyel olmayan yağ asitlerinden glutamik asit miktarının (2714 mg/100 g) ve aspartik asit miktarının (1493 mg/100 g)

olduğu anlaşılmıştır. Arjinin ve lösin dışında histidin, izolösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin ve valin amino asitlerin varlığı anlaşılmıştır. Fındıkta bulunan K, Mn, Mg, Ca, Fe, Zn, Na ve Cu minerallerinin ortalama miktarları ise 863 mg/100g, 186 mg/100g, 173 mg/100 g, 5,6 mg/100 g, 4,2 mg/100 g, 2,9 mg/100 g, 2,6 mg/100 g ve 2,3 mg/100 g olarak tespit edilmiştir [Köksal vd., 2006].

Protein kaynağı olarak bilinen hayvansal ürünlerin kısıtlı ve pahalı olması nedeniyle bitkisel ürünlerden protein kaynağı olarak faydalanma çalışmaları son yıllarda önem kazanmıştır. Özellikle protein içeriği fazla olan soya, kanola ve çeşitli bakliyatlarla ilgili birçok araştırma yapılmıştır ve yapılmaya devam etmektedir. Çalışmalarda özellikle saflaştırılmış bitkisel proteinler önem kazanmaktadır [Moure vd., 2002]. Ayrıca ekonomik nedenler başta olmak üzere vejetaryen eğilimlerin artması da bitki proteinlerine olan ilgiyi artırmaktadır [Aydemir vd, 2014].

Yağı çıkartıldıktan sonra elde edilen fındık küspesinde bulunan proteine olan ilgi de günden güne artmaktadır [Aydemir vd, 2014]. Elde edilen yağı alınmış fındık küspesi protein bakımından zengin selüloz bakımından fakir olduğundan çok değerlidir [Yalçın vd., 1998]. Yağı alınan fındık küspesinde %35-41 arasında protein olduğu anlaşılmıştır [Yağcı ve Göğüş, 2008]. Yine başka bir çalışmada yağı çıkarılarak işlenen fındıktan geriye kalan fındık küspesi, proteince zengin (yaklaşık %40) selülozca fakir olup (yaklaşık %9) değerli bir protein kaynağı olduğu belirtilmiştir [Doğan ve Bircan, 2010].

Ülkemizde fındık yağı üretimi sonucu ortaya çıkan zengin içerikli küspenin büyük miktarı 0,60TL/kg gibi çok düşük fiyatlarla ve genellikle yem sanayinde kullanılmak üzere satılmaktadır [TMO, 2015]. TMO tarafından rutin bir yağ çıkarma işlemi sonucu ortaya çıkan küspenin TS 323 e göre olması gereken değerleri ve analiz sonuçları Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Fındık KÜSPESİ Analiz Sonuçları [TMO, 2015].

| ANALİZ ADI | DEĞER | TS 323'E GÖRE FINDIK KÜSPESİ NÖRMLARI (EN ÇOK) |
|-----------------|-------|--|
| Rutubet (%) | 10,50 | 12 |
| Ham Protein (%) | 45,40 | 41 (EN AZ) |
| Ham Yağ (%) | 0,47 | 3 |
| Ham Kül (%) | 6,46 | 9 |
| Ham Selüloz (%) | 7,97 | 10 |

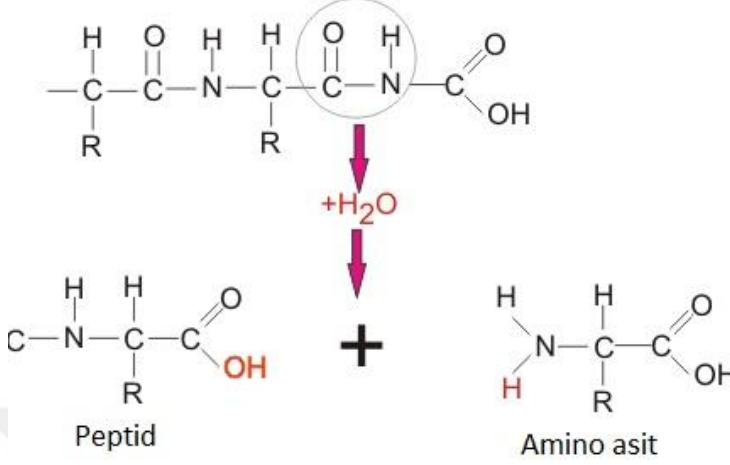
2.2.2 Fındığın Biyoaktif Özellikleri

Ülkemizde üretilen fındığın bir kısmı fındık yağı olarak işlenmektedir. İçerdiği yüksek doymamış yağ içeriği (oleik ve linoleik asit) nedeniyle kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu olduğu bilinen fındık yağının doku ve organların yaşlanmasını geciktirdiği, kanser hastalığının gelişimini yavaşlattığı ve içerdiği yüksek kalsiyum içeriği nedeniyle çocuklarda kemik ve diş oluşumuna yardımcı olduğu bilinmektedir. Ayrıca yağ içeriği nedeniyle kalsiyum hastaları tarafından tercih edilmektedir. Bu yağ asitleri düşük yoğunluklu lipoprotein değerini (LDL) düşürerek insan sağlığına fayda sağlamaktadır [Yücesan vd., 2010]. Fındık yağı vücutta karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasını düzenleyen B grubu vitaminlerin de önemli bir kaynağıdır. Yüksek miktarda E vitamini içerdiğinden, alyuvarların parçalanmasını engelleyerek kansızlığa karşı koyduğu ve cilt yapısını düzenlediği bilinmektedir. Zengin bir besin maddesi olan fındığın 100 gramı 725 kalori enerji sağlamaktadır. Fındık bu özellikleri nedeniyle beden ve zihin yorgunluğunu giderici, enerji verici, kalp ve damar sağlığını koruyucu özelliklere sahip bir gıdadır. Fındığın diğer bir önemli özelliği ise yüksek miktarda fenolik antioksidan madde içermesidir. Başta gallik asit olmak üzere, kafeik asit, vanilik asit, ferulik asit, sinapik asit ayrıca katekin, kaemferol, kuersetin bulunduğu anlaşılmıştır [Altun vd., 2013; Yurttaş vd., 2000] .

2.3 PROTEİNLERİN HİDROLİZİ

Proteinlerin asitlerle yada alkalilerle kimyasal yollarla veya enzimlerle enzimatik olarak alt birimlerine (monomerlerine, peptit ya da amino asitlerine)

ayrılmasına hidroliz denilmektedir. Şekil 2.1’de protein hidrolizinin mekanizması gösterilmiştir.



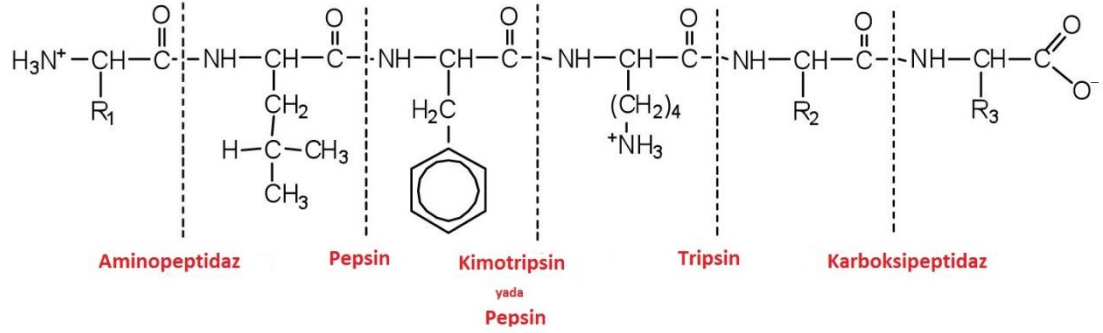
Şekil 2.1 Protein Hidrolizi (Boundless, 2016)

Kimyasal hidroliz hem kontrolün zor olması hem de besinsel kalitedeki azalma nedeniyle tercih edilmemektedir. Kimyasal hidroliz sonucunda bir taraftan L-formundaki amino asitler zarar görürken diğer taraftan lisin-alanin gibi toksik ürünler ortaya çıkabilmektedir [Ramarathnam vd., 1995]. Fakat enzimatik hidroliz sonucu ortaya çıkan son ürünler beslenme değeri açısından daha iyi sonuçlar vermektedir. Protein hidrolizinde kullanılan enzimlere proteolitik enzimler yada peptidazlar denilmektedir. Enzimatik hidroliz sonucu amino asit yapısı bozulmazken, kimyasal hidrolizdeki gibi yüksek ısılar ve pH seviyelerine ihtiyaç duyulmamaktadır. Proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu gıdaların besin içerikleri fazlaca etkilenmemekte ve çoğu zaman artmaktadır.

Gıda endüstrisinde protein hidrolizi üretiminde genellikle kimotripsin, tripsin ve pepsin gibi hayvansal kökenli proteolitik enzimler kullanılırken, bazı durumlarda bitkilerden veya mikroorganizmalardan elde edilen proteazlarda kullanılabilir.

Proteinlerin sindirimi C-N bağlarının hidrolizi ile olmaktadır. Peptidazlar endo ve ekzopeptidaz şeklinde 2’ye ayrılmaktadır. Endopeptidazlar iç taraftaki polipeptitleri parçalarken, ekzopeptidazlar terminal uçlardaki amino asitleri

ayırmaktadır. Ekzopeptidazlar kendi içlerinde aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar diye 2'ye ayrılmaktadır. Aminopeptidazlar terminal uçtaki amino asitin amin zincirini kırmaktadır. Karboksipeptidazlar ise zinciri karboksil tarafından kırmaktadır. Endopeptidazlara mide pepsinleri örnek verilebilir. Mide pepsinleri proteinleri iç bağlarından kırmaktadır. Bu durum kalorienin sindiriminde önemlidir. Mide pepsinleri toplam proteinin %20 civarını sindirse bile endopeptidaz oldukları için ince bağırsak ve pankreas sindirimini için gereklidir. Şekil 2.2.'de proteinlerin farklı peptidazlarla hidrolizi gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Proteinlerin farklı peptidazlarla hidrolizi [Bruice, 2010]

İnsan vücudunda protein sindirimi sonucu serbest amino asitler ve kolayca absorbe olabilecek düşük moleküler ağırlıkta peptitler ve bu peptitler ile orijinal protein arasında kalan polipeptitler olarak 2 farklı moleköl grubu ortaya çıkmaktadır. Serbest amino asitler ve düşük moleküler ağırlıktaki peptitler bağırsaklarda değişik seviyede emilmektedir. Bu emilim serbest amino asitler için jejunumda (ince bağırsağın üst yarısı) ileumdakine (ince bağırsağın alt yarısı) göre daha fazla olmasına rağmen peptit emilimi yaklaşık olarak aynıdır. Yüksek çekim gücüne (afinite) sahip amino asitler düşük olanların emilimini rekabetçi bir şekilde inhibe etmektedir. Fakat düşük moleküler ağırlıktaki peptitlerin emilimi serbest amino asitlere göre belirgin derecede daha fazladır. Bu durum başta kandaki amino asit miktarı olmak üzere protein sentezi gibi birçok fizyolojik ve metabolik olayı etkilemektedir [Savoie vd., 2005].

Sindirim sonucu ortaya çıkan orta büyüklükteki polipeptitler ise mineral taşıma, hormonal dürtüler, opioid, antihipertansif, antitrombotik, antioksidan, bağışıklık ve antibakteriyel özellikler gibi birçok önemli biyolojik aktivitede rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda opioid aktiviteye sahip peptitler buğday gluteninden izole edilebilirken, kazein sindirimi sonucu biyoaktif peptitler ortaya çıkmaktadır. Yine sindirim ve absorpsiyon bozuklukları olan hastalıklarda soya proteinin hidrolizi ile elde edilen bazı peptitler kullanılırken, soya proteinin bazı amino asit dizilimlerini içeren peptitlerinin antioksidan etkisi olduğu görülmüştür [Savoie vd., 2005].

Hidroliz sonucu ortaya çıkan hidrolizatlar amino asit miktarlarının fazla olması ya da hidroliz sonucu aktifleşen amino asit dizilimlerinin biyoaktif özellikleri bakımından kategorize edilebilirler ve oluşan bu peptitler kendini oluşturan proteinlerden tamamen farklı besinsel, fonksiyonel veya biyolojik özellikler içerebilmektedir. Bu özellikleri ile enzimatik hidrolizatlar gıda endüstrisi, kimya ve eczacılıkta kullanılabilir [Kong, 2006]

İnsan sindirim sisteminde biyoaktif peptit üretimini ve sindirim sisteminin kinetiğini in-vitro koşullarda anlamaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam etmektedir. Bu çalışmalar sonucu bir taraftan sindirim sonucu ortaya çıkan biyoaktif peptitlerin tanımlanması yapılırken diğer taraftan enzimatik süreci etkileyen faktörler belirlenmektedir [Savoie vd., 2005].

2.4 BİYOAKTİF PEPTİTLER

Biyoaktif peptitler genellikle gıda kökenli olup besinsel özellikleri yanında hormon benzeri fizyolojik bir etki yaratırlar. Biyoaktif peptitler süt, yumurta, et, balık gibi et ve et ürünleri dışında kolay ulaşılabilir ve ucuz olmaları nedeniyle bitki kökenli de olabilir. Gıda yapısında genellikle inaktif olarak bulunan bu peptitler protein molekülünün sindirim esnasında yada gıda işlenmesi sayesinde (peynir olgunlaştırması, fermantasyon vs.) enzimatik hidroliz ile aktif hale gelmektedirler. Çizelge 2.4.'te gıdalardan üretilen bazı biyoaktif peptitler görülmektedir.

Çizelge 2.4. Gıdalardan üretilen bazı biyoaktif peptit örnekleri [Hartmann ve Meisel, 2007]

| <i>Etki</i> | <i>Orijin</i> | <i>İlgili Protein</i> | |
|-------------------------------------|---------------|---|-------------------------------------|
| ACE inhibisyonu/ Antihipertansif | Soya | Protein | |
| | Balık | Protein | |
| | Et | Protein | |
| | Süt | | α -LA, β -LG |
| | | | α -, β -, κ -CN |
| | Yumurta | | Ovotransferrin |
| | | | Ovalbumin |
| Buğday | | Gliadin | |
| Brokoli | | Bitki proteini | |
| İmmünomodülatör | Pirinç | Albumin | |
| | Yumurta | Ovalbumin | |
| | Süt | α -, β -, κ -CN, α -LA | |
| | Buğday | Gluten | |
| Sitomodülatör | Süt | α -, β -CN | |
| Opioid agonist | Buğday | Gluten | |
| | Süt | α -LA, β -LG | |
| | | α -, β -CN | |
| Opioid antagonist | Süt | Laktoferrin | |
| | | κ -CN | |
| Antimikrobiyal | Yumurta | Ovotransferrin | |
| | | Lizozim | |
| | Süt | Laktoferrin | |
| α -, β -, κ -CN | | | |
| Antitrombotik | Süt | κ -CN (glikomakropeptit) | |
| Mineral bağlama, antikaryojenik | Süt | α -, β -CN | |
| Hipokolestrolemik | Soy | Glisin | |
| | Süt | β -LG | |
| Antioksidan | Balık | Sardalya eti | |
| | Buğday | Buğday germ proteini | |
| | Süt | α -LA, β -LG | |

Endüstriyel süt ürünleri için kullanılan starter kültürler yüksek proteolitik aktiviteye sahiptir. Fermente süt ürünlerinde starter ya da starter olmayan bakteriler tarafından biyoaktif peptitler meydana getirilmektedir. *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *L. Delbrueckii spp. Bulgaricus* gibi laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemleri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Bu sistem hücre membranlarına

bağlı proteinazlardan ve endopeptidaz, aminopeptidaz, tripeptidaz ve dipeptidaz gibi farklı hücre içi peptidazlardan kaynaklanmaktadır [Fitzgerald ve Murray, 2006].

Biyoaktif peptit üretimi büyük protein molekülünün enzimatik hidrolizi ile gerçekleşmektedir. Çoğu biyoaktif peptitin üretiminde pepsin ve tripsin gibi sindirim sistemleri enzimi kullanılmaktadır. Son yıllarda sığır as2-kazein ve sığır, koyun, keçi x-kazeinin tripsin ile hidrolizi sonrasında ACE inhibitör peptitleri elde edilmiştir. Ayrıca alkalaz, kimotripsin, pankreatin, pepsin, termolisin gibi çeşitli proteinazların yanı sıra bakteriyel veya fungal kaynaklardan elde edilen enzimler çeşitli proteinlerden biyoaktif peptit üretiminde kullanılmaktadır. Peptitler doğal protein kaynaklarından geleneksel yollarla üretilmesinin yanı sıra rekombinant DNA teknikleri ile özel peptitler ya da ön maddelerinin mikroorganizmalar ile üretilmesi konusunda çalışmalar yapılmaktadır [Şanlıdere ve Öner, 2006].

Peptitler, bazı gıdalarda doğal olarak bulunabildikleri gibi proteinlerin enzimlerle in-vivo ve in-vitro olarak hidrolizi ile elde edilebilmektedirler. Genellikle 3-20 amino asitten oluşan bu biyoaktif peptitler bazı durumlarda daha fazla amino asit içerebilir. Sindirim sisteminde enzimatik hidrolizle ortaya çıkan biyoaktif peptitler ince bağırsaklardan kan dolaşımına geçmesi sayesinde sistematik fayda sağlar. Biyoaktif peptitlerin amino asit dizilimine bağlı olarak kan basıncı düşürme, immün sistemini güçlendirici, antimikrobiyal, antioksidan, kolesterol düşürme, mineral bağlama, safra asitlerini bağlama ve tansiyonu düşürme gibi biyoaktif özelliklere sahiptirler. Bazı biyoaktif peptitler multifonksiyonel olup birden fazla fonksiyonel fayda sağlayabilirler [Erdmann vd, 2007]

2.5 BİYOAKTİF PEPTİTLER VE KARDİYOVASKÜLER SAğLIK

Kardivasküler hastalıklar tüm dünyada birincil derecede ölüm sebeplerinden birisidir. Gelişmiş ölkelerde gelişmekte olan ölkelere göre ölüm oranının fazla olması bu hastalıklar ile yaşam ve beslenme tarzı arasındaki dolaysız ilişkinin önemli bir ispatı olarak görölmektedir. Gelişmiş ölkelerde her yıl 2,4 milyon kişi kronik kalp hastalıklarına bağlı olarak yaşamını yitirdiği bildirilmiştir [Samur ve Yıldız, 2008].

Birçok gelişmiş ülkede bu kapsamda kalp hastalıklarını azaltmaya yönelik çeşitli diyet önerileri yapılmaktadır. ABD de meyve ve sebze bakımından zengin ve düşük yağlı süt ürünleri tüketimini destekleyen DASH diyet (Dietary Approaches to Stop Hypertension) gibi diyet programları ile kalp hastalıklarını önlemek için çeşitli kampanyalar yapılmaktadır [Erdmann vd, 2007].

Yapılan bir çalışmada, yüksek tansiyonun önlenmesi ve tedavisinde meyve sebze tüketiminin artırılıp düşük yağlı süt ürünlerinin kullanıldığı diyet programlarının daha etkili olduğu anlaşılmıştır [Appel vd., 1997].

Kalp hastalıklarını azaltmaya yönelik birçok çalışma olmakla birlikte günlük protein miktarını azaltıp karbonhidrat miktarını artırmaya yönelik olanların HDL'yi düşürürken beraberinde LDL'yi de düşürdüğü ve trigliserid miktarını artırdığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda yüksek bitkisel protein tüketiminin kardiyovasküler hastalıkları azalttığı bilinmektedir. ABD'de 1997 yılında yapılan OmniHeart (Optimal Macro-Nutrient Intake to Prevent Heart Disease) denemesinde günlük diyetle karbonhidrat miktarının azaltılıp düşük ve doymuş yağ içerikli protein miktarının artırıldığı durumlarda kilo kaybının gerçekleştiği, kan basıncının ve kalp hastalıkları riskinin azaldığı belirtilmiştir [Appel vd., 1995]. Bu durum günlük diyetle protein içeriğini artırmanın faydalarını gösterdiği için önemli kabul edilmektedir.

2.5.1 Antihipertansif peptitler

Yüksek kan basıncı genellikle arteriol denem küçük kan damarlarının daralması sonucu kanın damar duvarına daha fazla basınç yapmasıyla ortaya çıkar. Daralan damardan kanın geçebilmesi için kalp daha fazla çalışır ve genellikle kalp yetmezliği sorunu ortaya çıkar. Yüksek kan basıncı kalp dışında başka böbrek ve beyin başta olmak üzere birçok organa zarar vermektedir. Kalp, böbrek, göz ve beyin damarları bu yüksek basınca uzun yıllar boyunca dayanabilse de kan basıncındaki yükselme yıllarca, belirti vermeden ilerleyebilir. Birden ortaya çıktığı düşünülen kalp

krizleri, felçler ve böbrek yetersizliklerinin birçoğunun arkasında yüksek kan basıncı olduğu bilinmektedir [Erdmann vd, 2007].

Yüksek tansiyon hastalığına genelde bazı hastalıklar eşlik etmektedir. Bunların bazıları şeker hastalığı, dislipidemi ve obezite'dir. Bu hastalıkların bir ya da birkaçı yüksek tansiyonla bir araya geldiğinde kan damarlarında ateroskleroz (sertleşme) ve kalp hastalıkları oluşumu kolaylaşmaktadır. Buna bir de sigara ve alkol kullanımı, sağlıksız beslenme ve hareketsiz yaşam tarzı eklenirse kalp hastalığı riski daha çok artmaktadır.

Yüksek kan basıncı bilinen en ciddi kalp rahatsızlığı risk faktörüdür. Bu hastalığın kronikleşmesi ile ortaya çıkan yüksek tansiyon hastalığının tedavisi son yıllarda üretilen ilaçlar sayesinde daha kolay olmaktadır. Tüm "yüksek tansiyon" hastalarında büyük tansiyonun 140 mmHg'nın, kk tansiyonun ise 90 mmHg'nın altına, hasta rahatsızlık hissetmediği durumlarda daha da düşük değerlere düşürülmesi gerekmektedir. Eğer yüksek tansiyon hastası kişide şeker hastalığı, inme riski, kalp krizi hikayesi, böbrek hastalığı gibi ilişkili hastalıklar varsa tansiyon değerleri 130/80 mmHg ve altında olmalıdır.

Günümüzde kullanılan pek çok yüksek tansiyon ilacı bulunmaktadır. Temel olarak tansiyon düşürücü ilaçlar diüretikler, kalsiyum kanal blokerleri ve beta-blokerler şeklinde sınıflandırılabilir. Fakat bu ilaçların ortak yan etkileri hastaların yaşam kalitelerini ciddi olarak düşürmektedir. Bu ortak potansiyel yan etkilerden bazıları aşağıda belirtilmiştir.

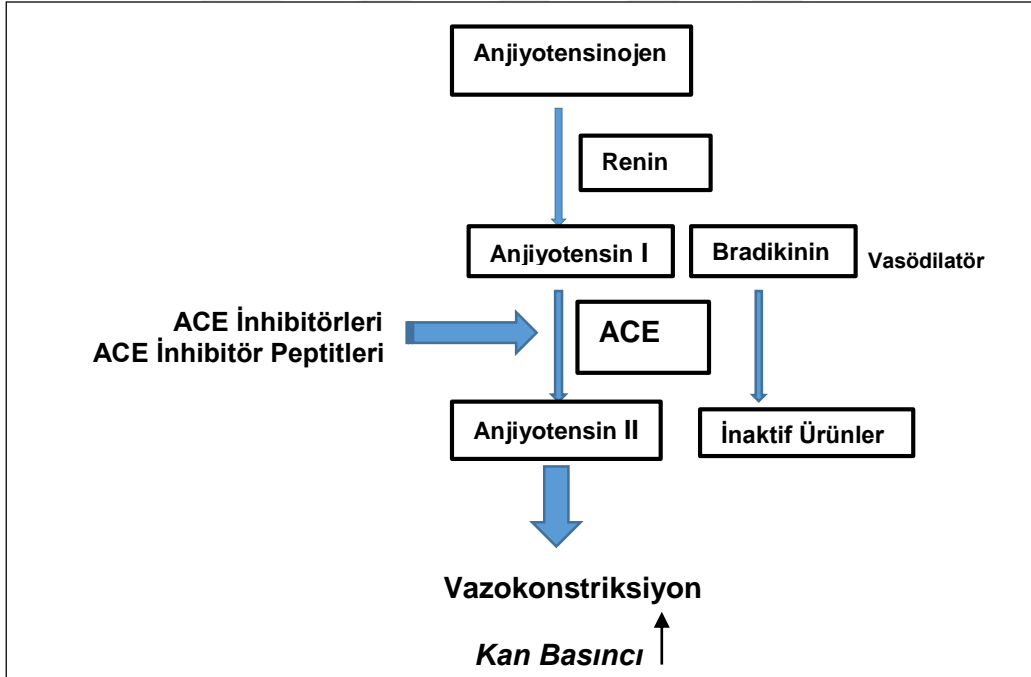
- Düşük kan basıncı (hipotansiyon)
- Baş dönmesi veya göz kararması
- Sık bayılma
- Çarpıntı
- Uyuklama, gcszlk yorgunluk
- Eklem veya bel ağrısı
- Kabızlık

- Cinsel isteksizlik, iktidarsızlık
- Depresyon
- Alerjik reaksiyon

2.5.2. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) ve ACE İnhibitörleri

Yüksek kan basıncı oluşumunda Anjiyotensin Dönüştürücü Enzimin (ACE) çok önemli bir rolü bulunmaktadır. Vücutta su ve tuz kaybı olduğunda böbrekten renin salınımı meydana gelir. Bu da karaciğerde sentezlenen anjiyotensinojeni anjiyotensin I'e dönüştürür. Anjiyotensin I ise birçok damarın endotelinde bulunan, pulmoner damarlarda ise yüksek konsantrasyonlarda varolan ACE ile anjiyotensin II'ye dönüşür (Şekil 2.3). Anjiyotensin II ise adrenal korteksten aldosteron sekresyonunu uyarır ve kuvvetli bir vazokonstriktördür (damar tıkcayıcı) [Turgut, 2005]

Şekil 2.3. Anjiyotensinojenin anjiyotensin II'ye dönüşümü [Erdmann vd, 2007]



Şekil 2.5.5' de belirtildiği üzere, kan basıncı herhangi bir nedenle normal seviyenin altına düşmesi durumunda böbrekler proteolitik bir enzim olan renini salgılamaktadır. Renin plazmada bol miktarda bulunan ve karaciğerde sürekli bir şekilde sentezlenerek serbest hale gelen anjiyotensinojen adlı bir peptidin üzerine etki ederek inaktif anjiyotensin I in oluşumunu katalizlemektedir. Plazmada bulunan ACE

inaktif anjiyotensin I'i oldukça aktif bir oktapeptit olan anjiyotensin II ye dönüştürmektedir.

Anjiyotensin II kardiovasküler sistem ve adrenal korteksteki aldosteron sentezi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [Selçuk,2002]. Anjiyotensin II, kardiovasküler sistem üzerinde bilinen en güçlü etkiye sahip vazokonstriktördür (damar daraltıcıdır) ve kan basıncının yükselme gücü noradrenaline göre 40 kez daha fazladır. Anjiyotensin ayrıca adrenal kortekste aldosteron sentezini ve salgılanmasını da artırır. Bu da Na ve su reabsorbsiyonunu artırarak indirekt olarak vazokonstriktör (hipertansif) etki gösterir.

Bu sistemin bloke edilmesi ya da engellenmesi kan basıncını düşürürken, kalp yetmezliği belirti ve bulgularını iyileştirmekte, diyabetik nefropatide renal fonksiyonun bozulmasını önlemektedir. Bu amaçla kullanılacak inhibitör ve blokerler şunlardır: RAAS renin inhibitörleri (β -blokerler), Anjiotensin II reseptör blokerleri, Aldosteron ve ACE inhibitörleri tarafından bloke edilebilir [Selçuk,2002].

Bu amaçla ticari olarak kullanılan ilaçlar olsa bile yan etkilerinin de etkisiyle doğal ilaç/ etken madde arayışları hız kazanmıştır. Plazma ve dokularda ACE'yi inhibe ederek güçlü bir endojen vazokonstriktör olan anjiyotensin II (A II) düzeylerini düşüren ve böylece antihipertansif etki gösteren ilaçlara ACE inhibitörleri denilmektedir. Anjiyotensin I in Anjiyotensin II'ye dönüşmesini sağlayan ACE'yi engelleyen ve çoğu gıda kaynaklı olan ACE inhibitörlerinin kan basıncını düşürmedeki etkileri pek çok klinik çalışmada gösterilmiştir. Bu biyoaktif peptitler hem önleme hem de yüksek tansiyonu tedavi etme etkileri nedeniyle dikkatleri üzerine çekmektedir. Elde edilen biyoaktif peptitlerin antihipertansif etkileri başta deney hayvanları olmak üzere insanlar üzerinde denenmiş ve çok olumlu sonuçlar alınmıştır. Yapılan in-vivo çalışmalarda biyoaktif peptitlerin kan basıncını ciddi oranda düşürdüğü görülmüştür.

ACE inhibitörleri hipertansiyonun yüksek renin formlarında daha etkilidir. Dietle sodyum kısıtlaması veya diuretik kullanımı ile hacim azalması meydana gelen

hastalarda ACE inhibitörü kan basıncında dramatik düşüş meydana getirir. Hipertansiyonda monoterapi olarak ACE inhibitörleri kullanıldığında iyi bir cevap, doz ve kullanılan kriterlere bağlı olmak üzere hastaların %35- 70’de elde edilmiştir [Williams,1988]. ACE inhibitörleri plazmadaki renin düzeyini aşırı derecede yükselterek güçlü bir vazodilatör (damar açıcı) olan bradikininin yıkımını azaltırlar. Bu şekilde kardiyovasküler sistemin bütününde anjiyotensin II düzeylerinin azalmasına bağlı olarak arteriyel vazodilatasyon yaparlar, total periferik damar direncini azaltıp ve kan basıncını düşürürler.

ACE inhibitörleri, ACE’ye yarışmalı olarak bağlanarak enzimin etkisini bloke ederek yüksek tansiyon oluşumunu engellemektedir. Özellikle C terminal bölgesinde prolin, lisin ve arjinin amino asitlerini içeren peptitlerin kuvvetli antihipertansif etkilerinin olduğu tespit edilmiştir [Kim ve Wijesekara, 2010]. Çizelge 2.5.’te farklı peptit kaynaklarının amino asit dizilimi ve ACE’yi %50 oranında inhibe edebilecek protein miktarları verilmiştir.

Çizelge 2.5. Bazı ACE inhibitörü peptitler [Erdmann vd, 2007]

| Peptit Kaynağı | Amino asit Dizilimi | IC ₅₀ (μmol/L) |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
| Süt (β- kazein) | VPP | 9,0 |
| | IPP | 5,0 |
| Süt (β- laktogloblin) | IPA (β- laktosin A) | 141,0 |
| | ALPM (β- laktosin B) | 928,0 |
| Balık (sardalya) | VY | 26,0 |
| Balık (palamut) | LKPNM | 2,4 |
| | LKP | 0,32 |
| Et (tavuk) | LKP | 0,32 |
| | IKW | 0,21 |
| | LAP | 3,5 |
| Et (domuz) | MNPPK (miyopentapeptit A) | 945,5 |
| | ITTNP (miyopentapeptit B) | 549,0 |
| Yumurta (ovalbumin) | LW | 6,8 |
| Soya (glisinin) | NWGPLV | 21 |
| Bugday (gliadin) | IAP | 2,7 |

ACE ile yüksek tansiyon arasındaki bu direk bağlantı nedeniyle ACE aktivitesini engellemek amacıyla kaptopril, enalapril, alasepril ve lisinopril gibi inhibitörleri içeren birçok ilaç olsa da öksürük, çeşitli cilt problemleri, anjiyonerotik edema gibi birçok yan etkisi nedeniyle araştırmalar doğal ve güvenilir olanı bulmaya doğru kaymıştır. Süt ve süt ürünlerinden, soya, bezelye, mercimek gibi bitkisel proteinler ve alglerden diğer deniz ürünleri artıklarından elde edilen proteinlerin ACE inhibisyon etkisi üzerine in vitro ve in vivo çalışmalar yapılmıştır. Bu kaynaklardan elde edilen proteinler tripsin, pepsin, kemotripsin, alkalaz gibi farklı proteolitik enzimlerle hidroliz edilerek biyoaktif peptit üretimi gerçekleştirilmiştir [Kim ve Wijesekara, 2010; Abubakar vd., 1998; Fitzgerald ve Meisel, 2000; Sheih vd., 2009; Suetsuna, 1998; Suetsuna ve Chen, 2001; Gao ve ark.,2010].

Yapılan çalışmalarda normotansif konularda bu peptitleri uygulamanın tansiyonu düşürmede hemen hemen hiç etkisi olmadığı bildirildiğinden biyoaktif peptitlerin özellikle ılımlı seyreden hipertansiyon hastalarda ilk tedavi ya da yardımcı tedavi olarak uygulanabileceğı belirtilmiştir. Uygulamanın diğer tedavi türlerine göre ucuz olması ve sentetik ACE engelleyicilerine göre yan etkilerinin olmaması biyoaktif peptitlerin rahatlıkla uygulanabileceğini göstermiştir [Erdmann vd, 2007]

Kobay hayvanları ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda bazı biyoaktif peptitlerin antihipertansif etkisi gösterilmiştir. Zein'in saflaştırılmamış hidrolizatının 5g/kg dozlarında oral yoldan alınması ile SHR kan basıncı 6h sonunda ciddi derecede düştüğü görülmüştür [Miyoshi vd., 1991]. Aynı şekilde sardalya hidrolizatı 2.0gr/ kg dozlarda verildiğinde SHR de ciddi bir antihipertansif etkisi olduğu görülmüştür [Sugiyama vd., 1991]. Kurumuş palamutun thermolisin hidrolizatı 500mg/kg dozlarda alındığında 6 saatte ciddi kan basıncı düşürme etkisi olduğu anlaşılmıştır [Fujita vd., 1995]

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 MATERYAL:

Çalışmamızda materyal olarak Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yağı alındıktan sonra izoelektrik çöktürme yöntemiyle saflaştırılan fındık proteini konsantresi kullanılmıştır.

Protein konsantresi eldesi için ilk önce fındık yağı uzaklaştırılmıştır. Yağı alınmış fındık tozu eldesi için kavrulmamış kabuklu, çiğ, tombul fındık çeşidi kullanılmıştır. 500 g kabuklu çiğ fındık 2000 ml'lik bir beher içinde 1000 ml su ile ıslatılarak 1 gece bekletilmiş, 30°C'ye ayarlanmış etüvde 6 saat boyunca kurutulmuş ve kabukları temizlenmiştir. Geriye kalan 430 g kabuksuz çiğ fındık öğütülmeden önce protein denatürasyonunu engellemek için -198°C sıvı azot içinde dondurulmuş ve değirmende (IKA-Werke M20, Almanya) öğütülmüştür. Öğütülen fındıklar petrol eteri ile birlikte blenderden geçirilerek fındık parçacıklarının eter ile homojen karışımı sağlanmıştır. Karışım manyetik karıştırıcı da 6 saat boyunca karıştırılmış ve 6 saat sonunda vakum pompası ile kaba filtre kağıdından süzildikten sonra, yeniden petrol eteri ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 6 saat süresince karıştırılmıştır. Örnekler yeniden vakum pompası ile kaba filtre kağıdından süzildikten sonra 30°C sıcaklığa ayarlanmış etüv içerisinde 1 saat boyunca kurutularak petrol eterinin uzaklaştırılması sağlanmıştır [Öztop, 2014].

Yağı alınmış fındık tozundan protein konsantresi eldesi için fındık tozu 1/10 oranında saf su ile karıştırılmıştır. Karışımın pH'ı 1N NaOH ile 9'a ayarlanmış ve manyetik karıştırıcıda homojen bir karışım elde edilene kadar özütleme işlemine devam edilmiştir. Daha sonra 9.000g'de 4°C sıcaklıkta 30 dakika santrifüj edilerek çökelti ayrılmıştır. Üst faz 1M HCl ile pH 4,5'a ayarlanarak 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Üst faz 9.000g'de 4°C sıcaklıkta 30 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Altındaki katı çökeltiye saf su eklendikten sonra pH tekrar 4,5'a ayarlanmış ve 30 dakika daha karıştırılmıştır. Karıştırma sonrası 9.000g'de 4°C sıcaklıkta 30 dakika santrifüj edilerek üst faz ayrılmış ve katı çökelti 1M NaOH ile

nötrale edikten sonra liyofilizatörde 48 saat dondurularak kurutularak protein konsantresi elde edilmiştir [Öztop, 2014]

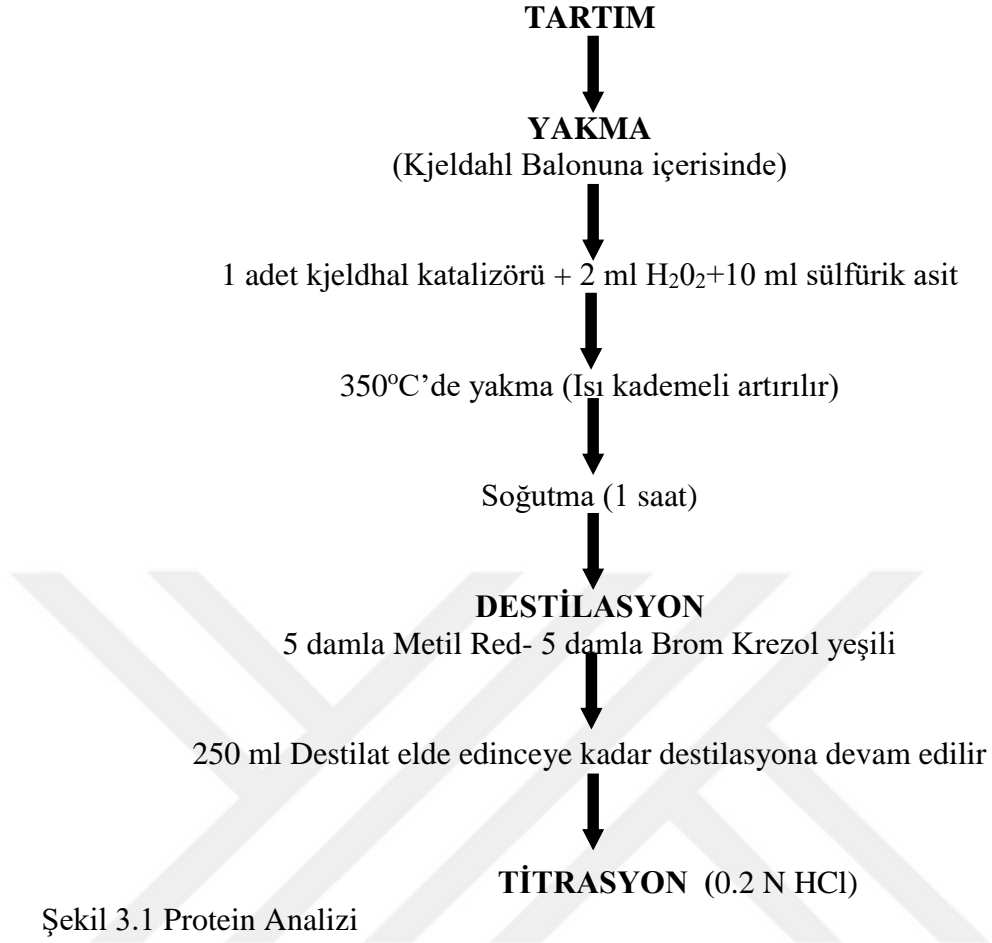
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Sülfürik asit (merch no:100731), kjeldhal katalizörü, hidrojen peroksit (sigma-aldrich no: H1009 %30), Metil Red (sigma-aldrich no: 32654), Brom Krezol yeşili (sigma-aldrich 114359), sodyum hidroksit (merc no:106462), borik asit (sigma-aldrich no: b6768), hidroklorik asit (sigma no:H1758), pepsin (sigma-p7000), tripsin (sigma t6763), Sodyum dihidrojen fosfat (merck M1063461000), fosforik asit (sigma-aldrich no:345245), di-sodyum hidrojen fosfat (merck no:106586), N-Hippuril-Histidin-Lösün Hidratı (Sigma no:H4884), Hippürik Asit (Sigma 112003), anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE- Sigma A6778 ; 0.25 unit), Trifloroasetik Asit (sigma T6508), Asetonitril (sigma no:271004)

3.2 YÖNTEM:

3.2.1 Protein Analizi

Protein miktarı tayini AACC-Method No. 46.12 [AACC, 2000]'de verilen Mikro Kjeldahl analiz yöntemine göre yapılmıştır. Yöntem yakma, destilasyon ve titrasyon aşamalarından oluşmaktadır. Yöntemin ilkesi azot içeren örneğin sülfürik asit (H_2SO_4) ile yakılarak içindeki tüm azotun $(NH_4)_2SO_4$ a dönüştürülmesi, daha sonra çözeltinin bazikleştirilmesi ve açığa çıkan NH_3 'ın damıtılıp standart bir asit çözeltisi içinde toplandıktan sonra nötrleşmeyen fazla asit miktarının titrasyonla saptanmasıdır. Titrasyonda tüketilen asit miktarı kullanılarak örnekteki toplam azot miktarını belirlendikten sonra 6,25 dönüşüm faktörü kullanılarak protein miktarı hesaplanmıştır. Çalışma 3 tekerrürlü olarak tekrar edilmiştir. Kjeldahl ile protein analizi akım şeması Şekil 3.1'de verilmiştir.

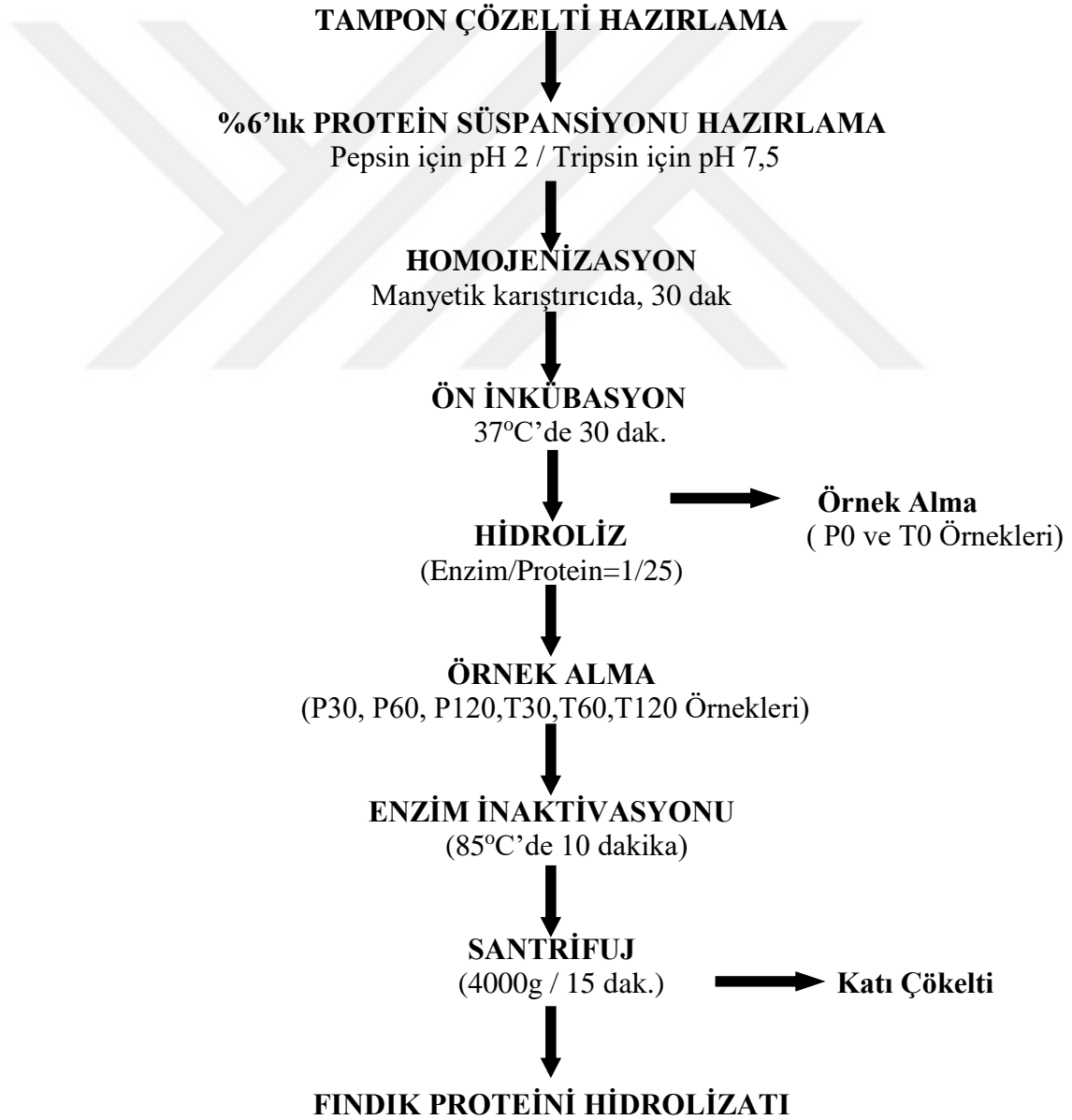


3.2.2. Protein hidrolizi

Protein hidrolizi Wu vd., (2006) yöntemi modifiye edilerek yapılmıştır. Hidroliz öncesinde toplam 100ml olacak şekilde 2 farklı pH’da %6 protein izolatu içeren sulu süspansiyon karışımı hazırlanmıştır. Süspansiyon karışımının hazırlanmasında pepsin hidrolizi için pH 2 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - \text{H}_3\text{PO}_4$) tamponu kullanılırken tripsin hidrolizi için pH 7,5 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - \text{H}_3\text{PO}_4$) tamponu kullanılmıştır. Protein izolatu süspansiyonları manyetik karıştırıcıda yarım saat karıştırılarak ve 37°C ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 30 dakika ön inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra Enzim/protein oranı 1/25 olacak şekilde pepsin ve tripsin enzimleri eklenmiştir. Hidrolizin başında enzim eklenmeden önce (0.dak), 30.dakikada, 60.dakikada ve 120.dakikada örnekler alınmıştır. Alınan örnekler enzim inaktivasyonu için 85°C’ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika bekletilmiş ve sonrasında 4000g’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst kısım alınarak daha sonra

yapılacak işlemler için -20°C’de muhafaza edilmiştir. Çalışma 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

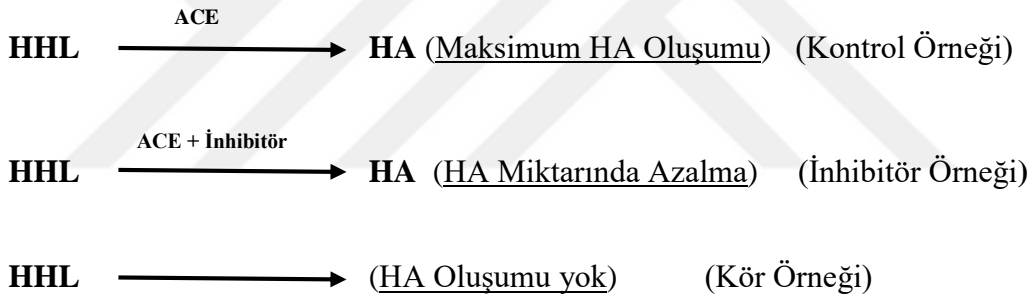
Çalışmada pepsin hidrolizinin başlangıcında enzim konulmadan önce alınan kontrol örneği P0, 30. dakikada alınan örneği P30, 60.dakikada alınan örnek P60 ve 120.dakikada alınan örnek ise P120 olarak adlandırılmıştır. Aynı şekilde tripsin hidrolizinin başlangıcında enzim konulmadan önce alınan kontrol örneği T0, 30. dakikada alınan örneği T30, 60. dakikada alınan örneği T60 ve 120.dakikada alınan örnek ise T120 olarak adlandırılmıştır. Protein hidrolizi akım şeması Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2. Pepsin ve Tripsin Protein Hidrolizi Akım Şeması

3.2.3 ACE inhibisyon Analizi

Fındık proteini hidrolizatının ACE inhibisyon etkisi Kwon vd. [2006] tarafından gerçekleştirilen yöntemin modifiye edilmesiyle belirlenmiştir. Yöntemin temeli, fındık hidrolizatının N-Hippuril-Histidin-Lösin'den (HHL) Hippürik Asit (HA) oluşumunu sağlayan ACE'nin inhibisyonu ilkesine dayanmaktadır. Çalışmada HHL'in ACE varlığında, inhibitör kullanılmadan %100 HA'ya dönüştüğü varsayılmıştır. İnhibitör kullanılmadan gerçekleştirilen bu örnekler "Kontrol Örneği" olarak adlandırılmıştır. HA'daki azalmanın araştırıldığı örneklerde ise değişik zamanlarda alınan protein hidrolizatları kullanılmıştır. Çalışmada, protein hidrolizati kullanılarak ACE'nin inhibe edildiği örnekler "İnhibitör Örneği" olarak adlandırılmıştır. ACE kullanılmadığı için reaksiyonun olmadığı fakat reaksiyonun kontrol edildiği örneklere ise "Kör Örnek" denilecektir. Örneklerin HA oluşumu üzerine etkileri Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3 Örneklerin HA oluşumu üzerine etkileri

ACE inhibisyon analizi, kontrol, inhibitör ve kör örneklerinin kullanıldığı HHL hidrolizi aşaması ve oluşan HA miktarının incelendiği HPLC okuması aşaması şeklinde 2 aşamada gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1 HHL Hidrolizi ve Enzim İnhibisyonu

Çalışmada inhibitör örnekleri hazırlanırken 40µl fındık hidrolizati ve 200µl 2.0mM HHL çözeltisi 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne konulmuş ve çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10 dakika ön inkübasyon yapılmıştır. Aynı şekilde stok olarak hazırlanmış 0,05U/ml ACE çözeltisi de 37°C'de 10 dakika bekletilmiş ve enzim

aktivasyonu sağlanmıştır. 10 dakika sonunda ACE çözeltisinden 40µl (2mU) alınarak fındık hidrolizatı +HHL çözeltisine eklenmiş ve rnek 37°C de 1 saat inkübe edilmiştir. 1 saat sonunda 85µl 1M HCl eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Örnekler 0,45 mikronluk teflon filtreden geçirilerek HPLC viallerine aktarılıp HPLC okuması yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan HHL ve ACE çözeltileri 300mM NaCl içeren 100mM pH 8,3 borat tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. Kontrol örneklerinde fındık hidrolizatı yerine H₂O kullanılırken, kr örneklerinde fındık hidrolizatı yerine H₂O ve ACE yerine ise tampon kullanılmıştır. İnhibitör, kontrol ve kr örneklerinin içerikleri izelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 İnhibitör, Kontrol ve Kr rneklerinin İçerikleri

| rnek Adı | Substrat Miktarı | Enzim Miktarı | İnhibitör Miktarı |
|------------------|------------------|---------------|-------------------------|
| Kontrol rneği | 200µL 2mM HHL | 40µL 2mU ACE | 40µL H ₂ O |
| İnhibitör rneği | 200µL 2mM HHL | 40µL 2mU ACE | 40µL Fındık Hidrolizatı |
| Kr rneği | 200µL 2mM HHL | Tampon zelti | 40µL H ₂ O |

3.2.3.2 HPLC Okuması:

HHL hidrolizi sonucu oluşan HA miktarı HPLC-UV/VIS (Shimadzu 20AD) cihazı kullanılarak ölçülmüş olup HPLC koşulları aşağıdaki gibidir.

Mobil Faz: A) %0,05 Trifloroasetik Asit (TFA) + %99,95 H₂O

B) %0,05 TFA + %99,95 Asetonitril

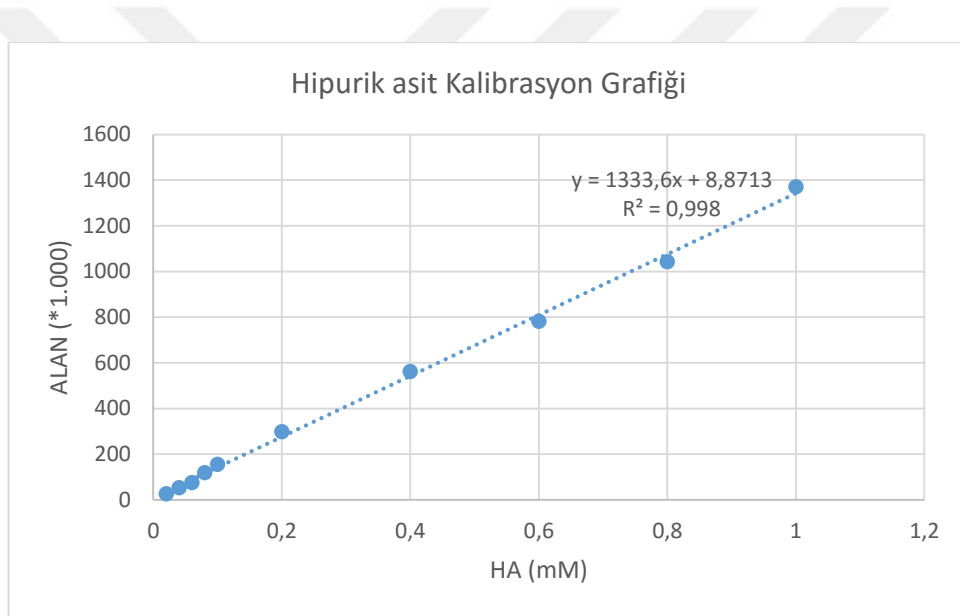
Kolon: İnertsil ODS 4 (4,6X150 mm 5µm)

Dereceli Elisyon :

| Zaman (dak) | Mobil Faz A (%) | Mobil Faz B (%) |
|-------------|-----------------|-----------------|
| 0 | 95 | 5 |
| 10 | 40 | 60 |
| 12 | 40 | 60 |
| 13 | 95 | 5 |
| 17 | 95 | 5 |

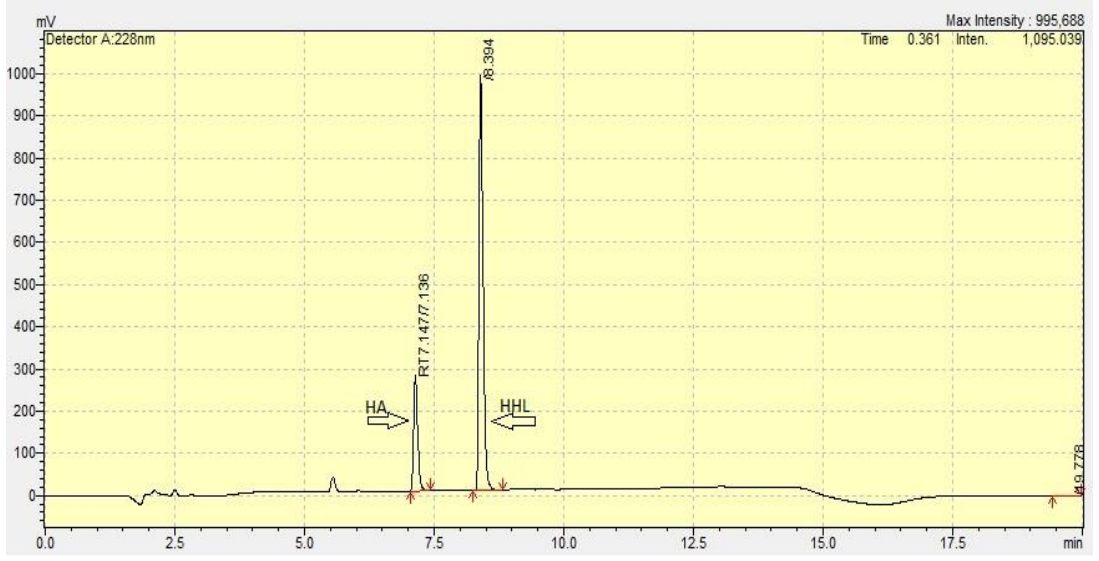
| | |
|-------------------|-----------|
| Akış hızı: | 1 min/dak |
| Enjeksiyon Hacmi: | 10µL |
| Dalga boyu: | 228 |
| Dedektör: | PDA |

ACE inhibisyon değerinin kantitatif analizi için Şekil 3.4'deki hippürik asit kalibrasyon grafiği kullanılmıştır. Kalibrasyon grafiği 0,02 mmol/L, 0,04 mmol/L, 0,06 mmol/L, 0,08 mmol/L, 0,1 mmol/L, 0,2 mg/L, 0,4 mmol/L, 0,6 mmol/L, 0,8 mmol/L ve 1,0 mmol/L Şeklinde 10 farklı konsantrasyonda standart çözelti kullanılarak hazırlanmıştır.



Şekil 3.4. Hippürik Asit Kalibrasyon Grafiği

Hippürik asit (HA) ve HHL'e ait tutulma zamanları sırasıyla 7,14 ve 8,30 dakikalarda gerçekleşmiştir. HA ve HHL'e ait HPLC kromatogramı Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5. HA ve HHL'ye ait HPLC kromatogram

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 BULGULAR

4.1.1 Farklı Hidroliz Zamanlarında Alınan Örneklerin ACE İnhibisyon Değerleri

Fındık izolatının pepsin ve tripsin ile hidrolizi esnasında farklı zamanlarda (0, 30, 60, 120 dak) alınan örneklerin %ACE inhibisyon değerleri (%İNH) hesaplanmıştır. Çalışmada ACE aktivitesi nedeniyle HHL HA'ya dönüşürken, oluşan HA konsantrasyon değeri HPLC'de ölçülmektedir. İnhibitör kullanılmadığı durumlarda maksimum HA sonucu veren kontrol örneklerinin HA konsantrasyon değeri ve fındık hidrolizatı kullanıldığı durumda oluşan HA konsantrasyon değerleri farkından inhibisyon etkisi bulunmuştur. %İNH hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$\%İNH = \frac{(M^{kontrol} - M^{örnek})}{M^{kontrol}} \times 100$$

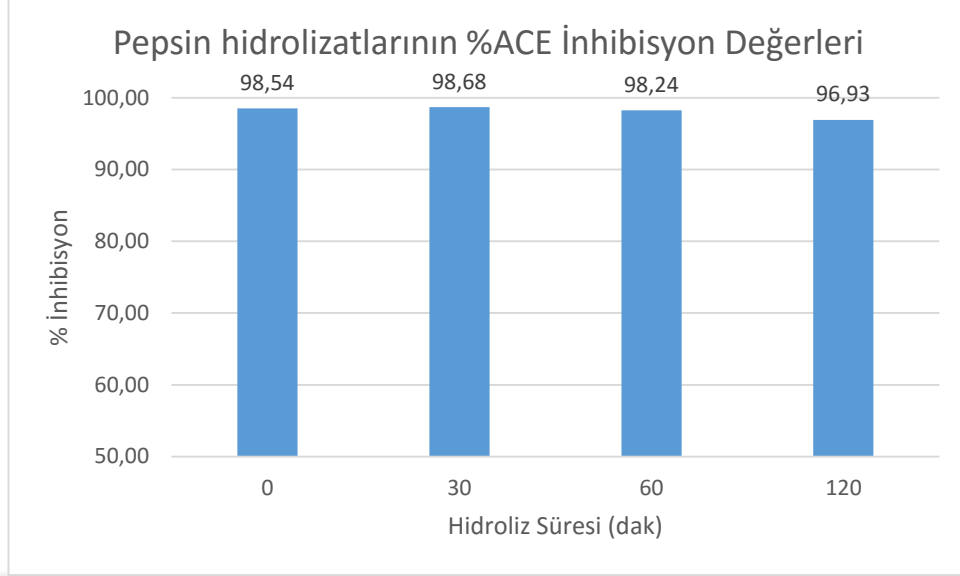
$M^{örnek}$: İnhibitör örneklerin HA konsantrasyon değeri

$M^{kontrol}$: Kontrol örneklerinin HA konsantrasyon değeri

Çalışmada kontrol örneklerinin ortalama HA konsantrasyon değeri 1,14mM olarak bulunmuştur ve %İNH değerinin hesaplanmasında $M^{kontrol}$ değeri olarak bu değer kullanılmıştır.

4.1.1.1 Farklı Zamanlardaki Pepsin Hidrolizatlarının %İNH Değerleri

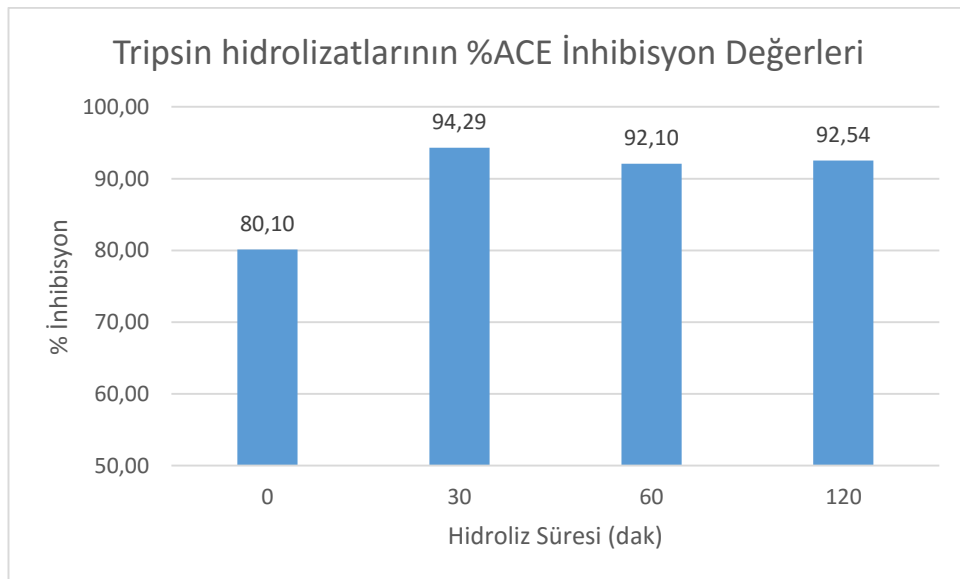
Fındık izolatının pepsin enzimi ile hidrolizi süresince farklı zamanlarda alınmış örneklere ait %İNH değerleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir. P0 örneğinin %İNH değeri incelendiğinde hidrolize başlanmadan önce ACE'nin %98,54 oranında inhibe olduğu görülmüştür. Hidroliz süresince alınan P30, P60 ve P120 örneklerinin %İNH değerinde dikkate değer bir değişiklik gözlenmemiş ve sırasıyla %98,68, %98,24 ve %96,93 inhibisyon değerleri bulunmuştur.



Şekil 4.1. Pepsin hidrolizatlarının %ACE İnhibisyon Değerleri

4.1.1.2 Farklı Zamanlardaki Tripsin hidrolizatlarının %İNH Değerleri

Tripsin hidrolizi süresince alınan örneklere ait %İNH değerleri Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. T0 örneğinde %İNH değerleri %80,10 olarak bulunmuştur. Bu değer hidroliz süresince ilk 30 dakikada artmış sonra önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Hidroliz süresince alınan T30, T60 ve T120 örneklerinde %İNH değerleri sırasıyla %96,29, %92,10 ve %92,54 bulunmuştur.



Şekil 4.2. Tripsin hidrolizatlarının %ACE İnhibisyon Değerleri

4.1.2 Pepsin ve Tripsin Hidrolizatlarının IC50 Değerlerinin Bulunması

Çalışmada seyreltilmeden kullanılan 40μL fındık proteini hidrolizatının ACE'yi yüksek oranda inhibe ettiği anlaşılmıştır. Gerek hidroliz öncesi gerek hidroliz süresince alınan örneklerde %İNH değerlerinin hem pepsin ve hem de tripsin örneklerinde %90 inhibisyon değerinin üzerinde olduğu görölmüştür. Fındık proteinini izolatının ACE inhibisyon etkisinin anlaşılması için ACE'nin çalışmasını %50 oranında inhibe edebilen protein miktarının (IC50) bulunması gerekmektedir. Bu nedenle hidroliz süresince değişik zamanlarda alınan fındık proteini hidrolizati örnekleri değişik oranlarda seyreltilerek IC50 değerleri bulunmuştur.

4.1.2.1. Pepsin Hidrolizatlarının IC50 Değerlerinin Bulunması

IC50 değerinin bulunabilmesi için farklı hidroliz zamanlarında alınan örnekler 2X ile 150X arasında değişen oranlarda seyreltilerek HHL hidrolizi gerçekleştirilmiştir.

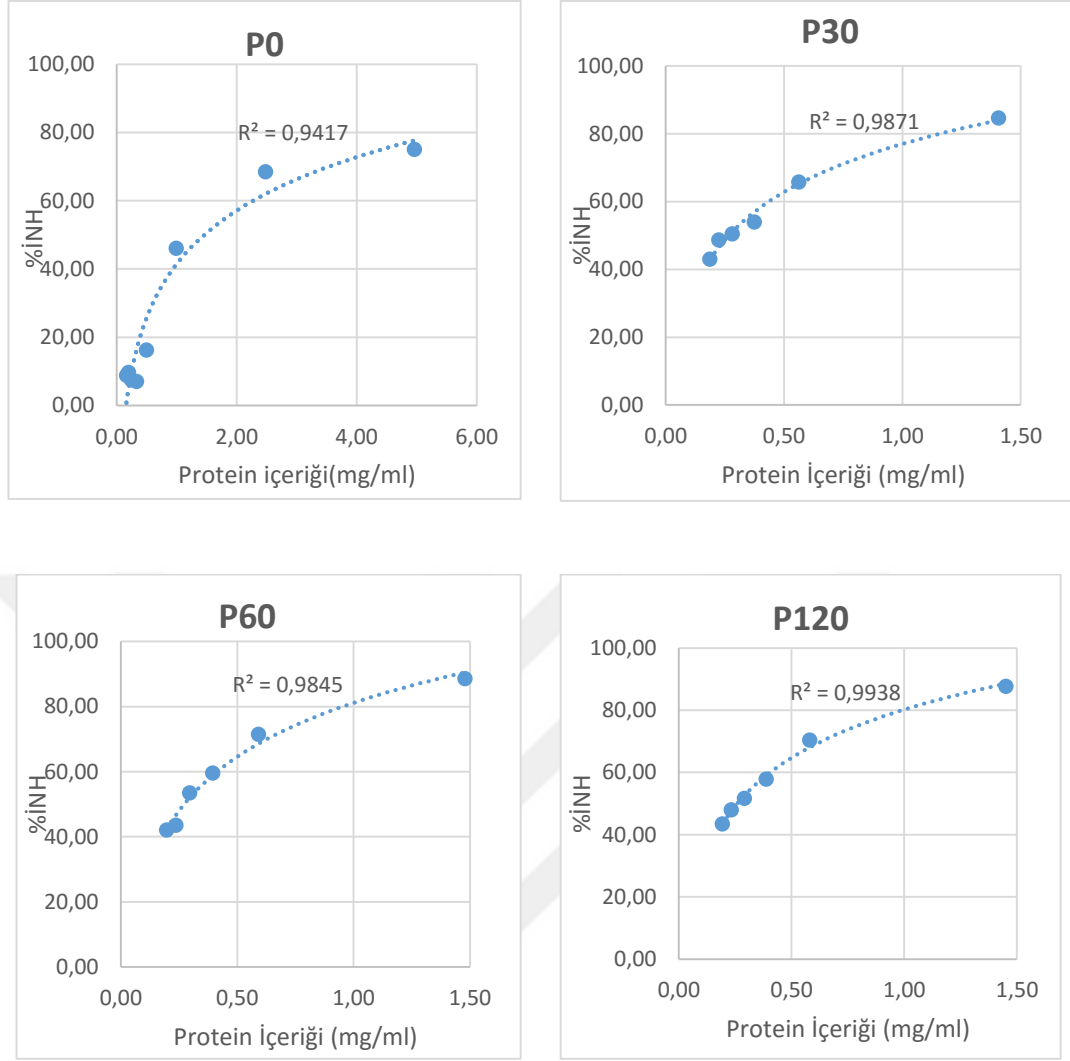
Aşağıdaki verilen izelge 4.1.'de P0, P30, P60 ve P120 örneklerine ait seyreltme oranına karşılık gelen %İNH ve Protein İçeriği değerleri görölmektedir.

Çizelge 4.1. Pepsin Hidrolizi % ACE İnhibisyon ve Protein İçeriği Değerleri

| Seyreltme oranı | P0 | | P30 | | P60 | | P120 | |
|-----------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|
| | % İNH | Protein İçeriği (mg/mL) | % İNH | Protein İçeriği (mg/mL) | % İNH | Protein İçeriği (mg/mL) | % İNH | Protein İçeriği (mg/mL) |
| 1 | 98,42±0,35 | 24,81±2,06 | 98,68±0,44 | 28,12±2,28 | 98,25±0,88 | 29,56±0,95 | 96,93±0,44 | 29,03±1,82 |
| 5 | 75,00±2,19 | 4,96 | - | - | - | - | - | - |
| 10 | 68,42±4,39 | 2,48 | - | - | - | - | - | - |
| 25 | 46,05±0,44 | 0,99 | 84,65±1,32 | 1,41 | 88,60±1,75 | 1,48 | 87,72±1,75 | 1,45 |
| 50 | 16,23±2,19 | 0,50 | 65,79±0,88 | 0,56 | 71,49±0,44 | 0,59 | 70,47±1,65 | 0,58 |
| 75 | 7,02±1,75 | 0,33 | 53,95±1,32 | 0,37 | 59,65±0,88 | 0,39 | 57,89±1,75 | 0,39 |
| 100 | 7,46±4,82 | 0,25 | 50,44±6,58 | 0,28 | 53,51±3,28 | 0,30 | 51,75±1,24 | 0,29 |
| 125 | 9,65±1,75 | 0,20 | 48,68±1,32 | 0,22 | 43,57±2,52 | 0,24 | 47,95±0,83 | 0,23 |
| 150 | 8,77±4,39 | 0,17 | 42,98±0,44 | 0,19 | 42,11±0,88 | 0,20 | 43,42±0,44 | 0,19 |

P0 hidrolizatı seyreltme yapılmadan önce ACE'yi %98,51 oranında inhibe etmiştir. Hidrolizatın seyreltme katsayısı arttıkça %İNH değeri azalmaktadır. Fındık protein hidrolizatının 5 kat seyreltilmesi sonucunda %inhibisyon değeri %75'e düşerken 50 kat seyreltme sonucu bu değer %16,23'e düşmüştür. 150 kat seyreltilmiş hidrolizatın %İNH değeri %8,77'ye kadar azalmıştır. Hidrolizin 30.dakikasında alınan örneklerin (P30) seyreltme işleminden önce %98,51 olan %ACE inhibisyon değeri seyreltme sonucu azalmıştır. Başlangıçta 28,12 mg/ml protein içeriğine sahip hidrolizat 50 kat seyreltme sonucu %İNH yaklaşık %33 değer kaybederek %65,79'e düşmüştür. P30 örneğinin 100 kat seyreltilmesi sonucu inhibisyon etkisi %50,44'e kadar azalmıştır. P30 hidrolizatının 150 kat seyreltilmesi sonucu ACE inhibisyon değeri %42,98'e gerilemiştir. Pepsin hidrolizinin 60.dakikasında alınan örneklerde (P60) başlangıçta ACE inhibisyon değerinin %98,68 olduğu görülmüş olup seyreltme ile bu değer azalmıştır. Hidrolizatın 50 kat seyreltilmesi sonucu inhibisyon değeri yaklaşık olarak %27 azalarak %71,49'e düşmüştür. Bu değer 100 kat seyreltme sonucu %53,51 olurken 150 kez seyreltilmiş örneğin ACE inhibisyon değeri %42,11 olmuştur. Pepsin hidrolizinin 120. dakikasında alınan örneklere (P120) ait başlangıçta %96,93 olan %İNH değeri hidrolizatın 50 kat seyreltilmesi sonucu yaklaşık olarak %26 azalarak %70,47 değerine düşmüştür. %İNH değeri hidrolizatın 100 kat seyreltme sonucu %51,75 olurken 150 kez seyreltilmiş örneğin ACE inhibisyon değeri %43,42 olmuştur.

Çizelge 4.1.'te verilen değerler kullanılarak çizilen seyreltilmiş hidrolizattaki protein içeriğine karşılık %İNH değerlerinin grafikleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. P0 örneğinde seyreltilmiş protein içeriği ve %İNH arasındaki ilişkinin %94,17 oranında logaritmik olarak açıklanabilir olduğu görülürken, P30, P60 ve P120 örneklerinde protein içeriği ve %İNH arasındaki ilişkinin sırasıyla %98.71, %98.45 ve %99.38 oranında logaritmik olarak açıklanabilir olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.3. Pepsin hidrolizatlarının protein içeriklerine karşılık %İNH değerleri

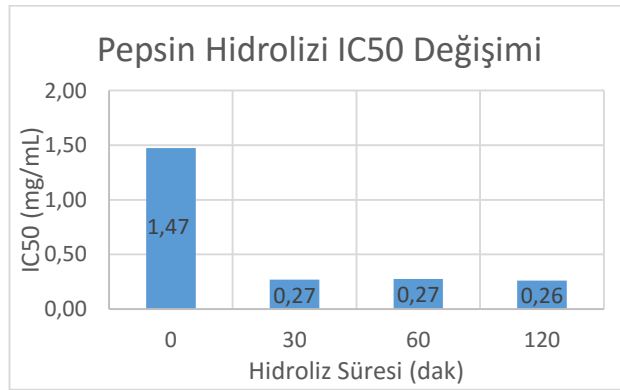
IC₅₀ değerinin matematiksel olarak hesaplanmasında grafiklerin logaritmik denklemleri kullanılmıştır. Şekil 4.3'teki P0 grafiğine ait denklem kullanılarak hesaplanan IC₅₀ değeri 1.47 mg protein/ml bulunmuştur. Aynı şekilde P30 grafiğine ait denklem kullanılarak hesaplanan IC₅₀ değeri 0,27 mg protein/ml bulunmuştur. P60 örneğinin IC₅₀ değeri de aynı şekilde P60 grafiğinin denklemini kullanarak hesaplanmıştır. P60 örneği için IC₅₀ değeri 0,27 mg protein/ml olarak bulunmuştur. Hidrolizin 120.dakikasında alınan örneklerin IC₅₀ değeri P120 örneğine ait denklem kullanılarak hesaplanmıştır. P120 için IC₅₀ değeri 0,26 mg protein/ml olarak bulunmuştur.

Pepsin hidrolizinin başında ve hidroliz süresince alınan örneklerin IC50 değerlerindeki değişim izelge 4.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. Pepsin Hidrolizatlarının IC50 Değerleri

| Örnek Adı | Hidroliz süresi (dak) | IC50 değeri (mg/mL) |
|-----------|-----------------------|---------------------|
| P0 | 0 | 1,47±0,067 |
| P30 | 30 | 0,27±0,011 |
| P60 | 60 | 0,27±0,015 |
| P120 | 120 | 0,26±0,005 |

Çizelge incelendiğinde hidrolizin başlangıcında alınan P0 örneğinin IC50 değeri (1,47mg protein/ml) hidrolizin 30.dakikasında alınan P30 örneğinde yaklaşık %80 azalarak 0,27 mg protein/ml’e düşmüştür. IC50 değerindeki bu azalma inhibisyon etkisindeki artış anlamına gelmektedir. Bu durumda pepsin hidrolizine başladıktan 30 dakika sonra fındık hidrolizatının inhibisyon derecesinin yaklaşık 5,5 kat arttığı söylenebilir. P60 örneğinin IC50 değeri 0,27 olurken P120 örneğinin IC50 değeri 0,26 olarak belirlenmiştir. Pepsin hidrolizi süresince IC50 değerinin zamana karşı değişimi Şekil 4.4’te gösterilmiştir. Şekil 4.4 incelendiğinde 30 dakikadan itibaren alınan örneklerde IC50 değerinde değişim olmadığı anlaşılmaktadır.



Şekil 4.4 Pepsin Hidrolizi sırasında IC50 değerindeki değişim

4.1.2.2. Tripsin Hidrolizatlarının IC50 Değerlerinin Bulunması

Tripsin hidrolizi süresince alınan örneklerin IC50 değerinin için örnekler 2X ile 150X arasında değişen oranlarda seyreltilerek HHL hidrolizi gerçekleştirilmiştir.

Aşağıda verilen Çizelge 4.3'te T0, T30, T60 ve T120 örneklerine ait seyreltme oranına karşılık gelen %İNH ve Protein İçeriği değerleri görülmektedir.

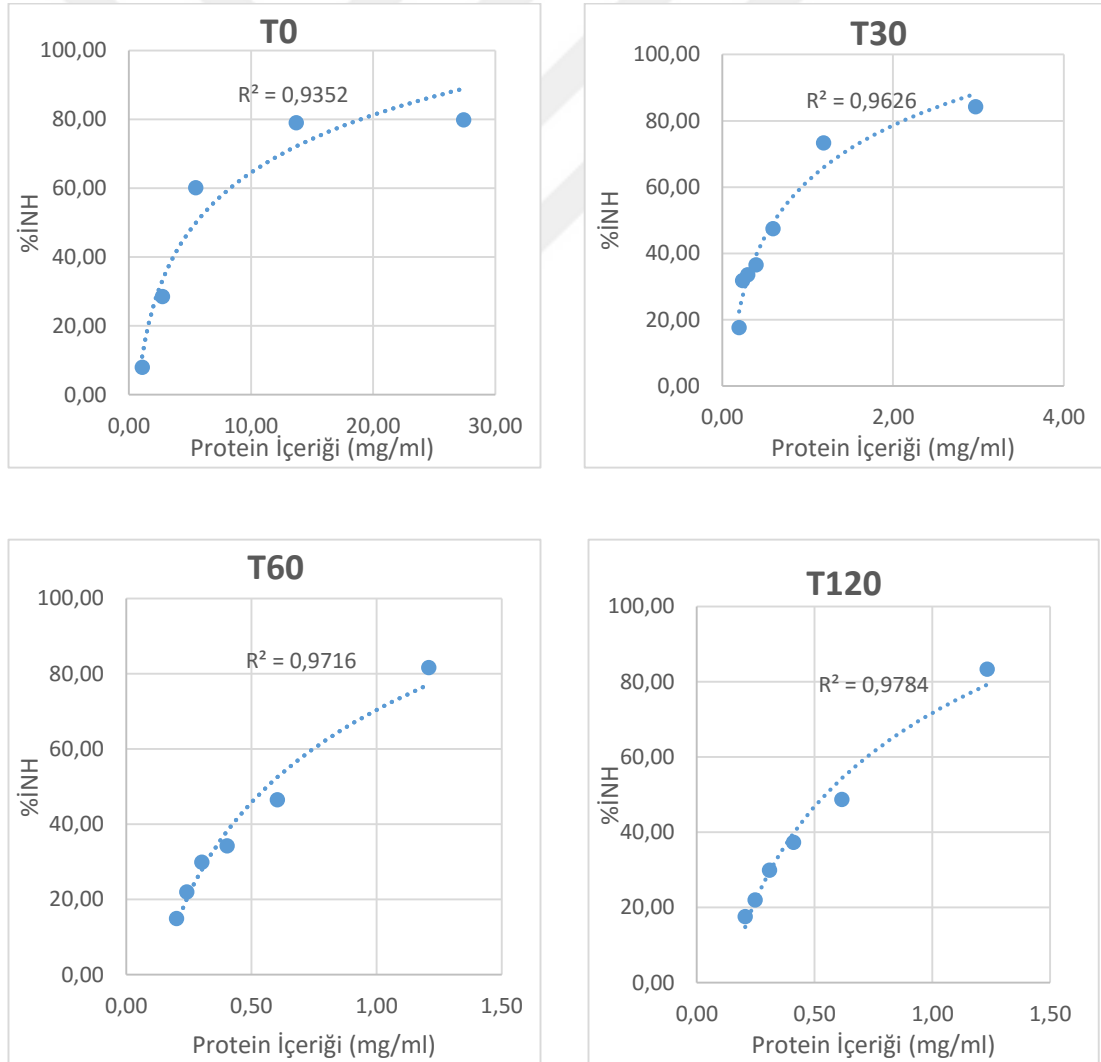
Çizelge 4.3. Tripsin Hidrolizi Örneklerinin İnhibisyon ve Protein İçeriği Değerleri

| Seyreltme oranı | T0 | | T30 | | T60 | | T120 | |
|-----------------|------------|-------------------------|------------|-------------------------|------------|-------------------------|------------|-------------------------|
| | % İNH | Protein İçeriği (mg/mL) | % İNH | Protein İçeriği (mg/mL) | % İNH | Protein İçeriği (mg/mL) | % İNH | Protein İçeriği (mg/mL) |
| 1 | 79,82±3,51 | 27,43±1,96 | 93,86±0,44 | 29,66±2,44 | 92,11±1,75 | 30,21±4,63 | 92,11±0,44 | 30,79±4,42 |
| 2 | 78,95±6,14 | 13,71 | - | - | - | - | - | - |
| 5 | 60,09±2,19 | 5,49 | - | - | - | - | - | - |
| 10 | 28,51±3,95 | 2,74 | 84,21±1,75 | 2,97 | - | - | - | - |
| 25 | 7,89±3,51 | 1,10 | 73,25±5,70 | 1,19 | 81,58±2,63 | 1,21 | 83,33±3,51 | 1,23 |
| 50 | - | - | 47,37±1,24 | 0,59 | 46,49±0,88 | 0,60 | 48,68±0,44 | 0,62 |
| 75 | - | - | 36,55±2,71 | 0,40 | 34,21±1,32 | 0,40 | 37,28±1,32 | 0,41 |
| 100 | - | - | 33,55±5,39 | 0,30 | 29,82±1,54 | 0,30 | 29,82±1,75 | 0,31 |
| 125 | - | - | 31,80±8,91 | 0,24 | 21,93±1,75 | 0,24 | 21,93±3,51 | 0,25 |
| 150 | - | - | 17,54±0,88 | 0,20 | 14,91±0,88 | 0,20 | 17,54±1,75 | 0,21 |

Seyreltme yapılmadan 27,43 mg/ml protein içeriğine sahip T0 örneğinin %İNH değeri %79,82 bulunmuştur. T0 örneğinin 5 kat seyreltilmesi sonucunda inhibisyon etkisi %60,09'a düşerken 10 kat seyreltme sonucu bu değer %28,51'e düşmüştür. 25 kez seyreltilmiş örneğin ACE üzerindeki inhibisyon etkisi %7,89'e kadar azalmıştır. Başlangıçta %93,86 %İNH değerine sahip T30 hidrolizatının 25 kat seyreltilmesi sonucu ACE inhibisyon değerleri yaklaşık %20 azalarak %73,25'e düşmüştür. 75 kat seyreltme sonucu inhibisyon etkisi %36,55'e kadar azalırken 150 kat seyreltme sonucu ise ACE inhibisyon etkisi %17,54'e gerilemiştir. T60 hidrolizatı başlangıçta %92,11 ACE inhibisyon etkisine sahipken 25 kat seyreltme sonucu inhibisyon etkisi yaklaşık olarak %11 azalarak %81,58 değerine düşmüştür. Bu değer 75 kat seyreltme sonucu %34,21 olurken 150 kez seyreltilmiş örneğin ACE inhibisyon

etkisi %14,91 olmuştur. T120 örneğinin ACE inhibisyon etkisi başlangıçta %92,11 olarak bulunmuştur. Hidrolizatın 25 kat seyreltilmesi sonucu inhibisyon etkisi yaklaşık olarak %10 azalarak %83,33 değerine düşerken 75 kat seyreltme sonucu %İNH değeri 37,28 olmuştur. 150 kez seyreltilmiş örneğin ACE inhibisyon etkisi %17,54 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3'te verilen değerler kullanılarak çizilen seyreltilmiş hidrolizattaki protein içeriğine karşılık %İNH değerlerinin grafikleri Şekil 4.5'te gösterilmiştir. T0 örneğinde seyreltilmiş protein içeriği ve %İNH arasındaki ilişkinin %93,52 oranında logaritmik olarak açıklanabilir olduğu görülürken, T30, T60 ve T120 örneklerinde protein içeriği ve %İNH arasındaki ilişkinin sırasıyla %96,26, %97,16 ve %97,84 oranında logaritmik olarak açıklanabilir olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.5. Tripsin hidrolizatlarının protein içeriklerine karşılık %İNH değerleri

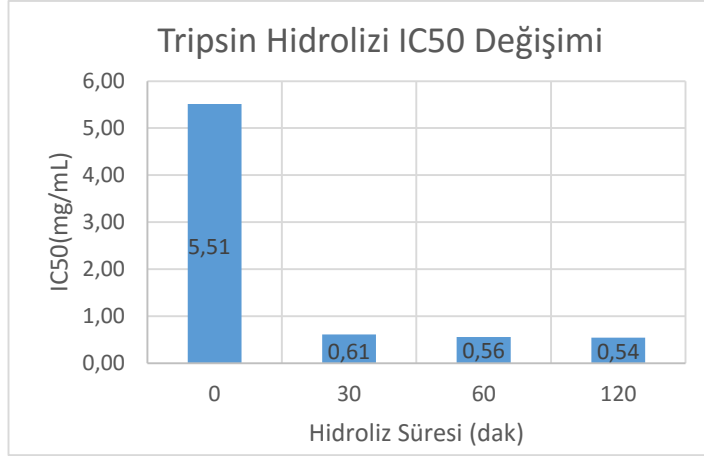
IC50 değerinin matematiksel olarak hesaplanmasında grafiklerin logaritmik denklemleri kullanılmıştır. Şekil 4.5'te T0 örneğine ait denklem kullanılarak hesaplanan IC50 değeri 5,51 mg protein/ml bulunmuştur. Aynı Şekilde T30 örneğinin IC50 değerinin hesaplanmasında T30'a ait denklem kullanılmıştır. T30 örneği için IC50 değeri 0,61 mg protein/ml bulunmuştur. T60 örneğinin IC50 değeri de aynı Şekilde hesaplanmıştır. T60 örneği için IC50 değeri 0,56 mg protein/ml bulunmuştur. Hidrolizin 120.dakikasında alınan T120 örneği için IC50 değeri 0,54 mg protein/ml olarak bulunmuştur.

Tripsin hidrolizi süresince IC50 değerlerinin zamana karşı değişimi Çizelge 4.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 4.4. Tripsin Hidrolizatlarının IC50 Değerleri

| Örnek Adı | Hidroliz süresi (dak) | IC50 (mg protein/mL) |
|-----------|-----------------------|----------------------|
| T0 | 0 | 5,51±0,001 |
| T30 | 30 | 0,61±0,034 |
| T60 | 60 | 0,56±0,009 |
| T120 | 120 | 0,54±0,007 |

T0 örneğinin 5,51 mg/ml olan IC50 değeri hidrolizin 30.dakikasında yaklaşık %90 azalarak 0,61 mg protein/ml değerine düşmüştür. IC50 değerindeki düşme inhibisyon etkisindeki artış anlamına gelmektedir. Bu durumda tripsin hidrolizine başladıktan 30 dakika sonra fındık hidrolizatının inhibisyon etkisinin yaklaşık 9 kat arttığı söylenebilir. T60 örneğinin IC50 değeri 0,56 olurken T120 örneğinin IC50 değeri 0,54 olarak belirlenmiştir. Tripsin hidrolizi süresince IC50 değerinin zamana karşı değişimi Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



şekil 4.6 Tripsin Hidrolizi sırasında IC50 değerindeki değişim

4.2. TARTIşMA

Çalışmada fındık izolatlarının 120 dakikalık hidrolizi sonucu P120 örneğinin IC50 değeri 0,26 mg/ml olurken T120 örneğinin IC50 değeri 0,54 mg/ml bulunmuştur. Literatürde fındık hidrolizatının ACE inhibisyonu üzerine etkisi konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Fakat farklı materyallerin kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. Mısır glütenin ACE inhibisyon aktivitesinin incelendiği bir çalışmada mısır gluteni alfa amilaz enzimi ile 3 saat boyunca hidroliz edildikten sonra flavorzim enzimiyle 8 saat boyunca 50°C’de hidroliz edilmiştir. Hidroliz süresince en düşük IC50 değeri 0,18 mg/ml olmuştur [Kim vd., 2004]. Yine soyanın enzimatik hidrolizinde pepsin ve pankreatinin birlikte kullanıldığı çalışmada IC50 değeri 0,34mg/ml bulunmuştur [Wu ve Ding, 2002]. Leguminin alkalaz enzimi ile 30 dakika hidrolizi sonucu ACE inhibisyon etkisinin araştırıldığı bir çalışmada IC50 değeri 0,18mg/ml bulunmuştur [Yust vd., 2003]. Soya sütünden yoğurt yapılan bir fermentasyon çalışması sonucunda IC50 değeri 0,28 mg/ml bulunmuştur [Donkor vd., 2005]. Peynir altı suyunun korolaz pp enzimiyle hidrolizi sonucu IC50’deki değişimin incelendiği başka bir çalışmada IC50 değeri 0,17 ile 0,88 arasında değişmiştir [Van der Ven vd., 2002]. Çalışmada elde edilen IC50 değerleri bu sonuçlarla karşılaştırıldığında fındık proteini hidrolizatının diğer bitkisel ve hayvansal protein kaynakları ile benzer sonuçlar verdiği görölmüştür.

Çalışmada hidroliz öncesi alınan P0 ve T0 kontrol örneklerinin IC50 değerleri sırasıyla 1,47 ve 5,51 mg protein/mL bulunmuştur. Hidroliz öncesi, sadece pH

ayarlaması nedeniyle ortaya çıkan bu farklılığın pH 2,0'de hazırlanan P0 örneğinin asidik hidrolize uğramasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmada 120 dakikalık hidroliz sonucu pepsin hidrolizatlarının tripsin hidrolizatlarına göre daha fazla ACE inhibisyon etkisine sahip olduğu anlaşılmıştır (0,26 mg/mL ve 0,54 mg/mL). Bu durumun ACE inhibisyon etkisine sahip amino asitlerin genellikle hidrofobik amino asitler olması (Li vd, 2004) ve pepsin enzimin de hidrofobik amino asitlere özgü [Otte vd, 2007] olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Çalışmada hidroliz süresince alınan örneklerdeki IC50 değerleri kontrol örneklerine (P0 ve T0) göre ciddi şekilde farklılık göstermiştir. P0 örneğinin IC50 değeri (1,47 mg/mL) 120 dakikalık pepsin hidrolizi sonucunda yaklaşık %64 azalarak 0,26 mg/mL değerine düşmüştür. T0 örneğinin IC50 değeri ise hidroliz sonunda %91 azalarak 5,51 mg/mL den 0,54 mg/mL'e düşmüştür. Başka bir deyişle pepsin hidrolizi süresince %İNH 5,65 kat artarken, tripsin için bu değer 10,2 olmuştur. Bu durum tripsin hidrolizi süresince oluşan peptitlerin başlangıca göre daha fazla inhibisyon etkisi kazandığını göstermektedir. Pepsin hidrolizatlarının genel olarak daha yüksek IC50 değerine sahip olmasına rağmen 120 dakikalık hidroliz süresince tripsin hidrolizatlarına göre daha az inhibisyon etkisi kazanmasının hidrolizde etkilediği amino asit bağları ve hidroliz sonucu ortaya çıkan biyoaktif peptitlerdeki amino asit dizilimi başta olmak üzere birçok nedeninin olabileceği düşünülmektedir. Cha ve Park (2005) tarafından yapılan benzer bir çalışmada albümin, kazein, soya proteini izolatu, buğday gluteni ve zein SS103 proteaz enzimiyle hidroliz edilmiş ve hidroliz sonucu hidrolizattaki IC50 değeri ile hidroliz öncesindeki kontrol örneklerinin IC50 değerleri karşılaştırılmıştır. Çalışmada albümin, kazein, soya proteini izolatu, buğday gluteni ve zeinin hidroliz öncesi IC50 değerleri sırasıyla 8,93, 8,45, 7,57, 9,54 ve 7,96 mg/ml olurken hidroliz sonrası sırasıyla 2,35, 1,82, 0,14, 2,89, 1,38 mg/ml olmuştur. IC50 değerindeki bu azalma sonucu ACE inhibisyon etkisi sırasıyla %74, %79, %99, %70 ve %83 artmıştır. Yapılan çalışmalarda başta prolin olmak üzere bazı amino asitlerin ACE inhibisyonuna etkisinin daha fazla olduğu görülmüştür [Otte vd, 2007]. Yine

hidroliz sonucu P-F-H yapısındaki amino asit zincirine sahip hidrolizatların daha fazla ACE inhibisyonuna neden olduğu görülmüştür [FitzGerald vd, 2004]

Çalışmada hidroliz yapılmadan önce pH 7,5’da ön inkübasyon yapıldıktan hemen sonra alınan T0 kontrol örneklerinin %İNH değeri (%80,10) aynı yöntemle fakat pH 2,5’ta hazırlanmış P0 örneklerinin %İNH değerine (%98,54) göre yaklaşık %19 daha az %İNH değerine sahip olduğu görülmüştür. Fındık proteinin ACE inhibisyon etkisi üzerine yapılmış ender çalışmalardan olan Aydemir vd. (2014) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da farklı yöntemlerle elde edilen fındık izolatlarının pH 7,0 de farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanmış ve hidroliz yapılmadan ACE inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Çalışmada soğuk özütlenmiş protein izolatu, sıcak özütlenmiş protein izolatu ve sıcak özütlendikten sonra aseton ile yıkanarak elde edilmiş fındık izolatlarının IC50 değerleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucu soğuk özütlenerek hazırlanmış izolatuın IC50 değeri 1,0 mg protein/mL olurken en düşük IC50 değeri 0,54 mg protein/mL ile sıcak özütlendikten sonra asetonla yıkanmış izolatta olduğu görülmüştür. Çalışmada bütün örneklerde %70-80 aralığında maksimum ACE inhibisyonu görüldüğü belirtilmiştir. Bu durumun nedeni olarak %20-30’luk bir protein grubunun ACE inhibisyonuna dirençli olabileceği ifade edilmiştir. Çalışmada belirtilen %70-80 maksimum %İNH değeri T0 örneğinde elde edilen %80,2 ACE inhibisyon değeri ile uyum göstermektedir. Chiang vd (2005) tarafından soya proteini izolatları ile yapılan bir çalışmada ise pH 2,0 ile pH 7,5 arasında hazırlanan başlangıç örneklerinin %İNH değerinin sıfır olduğu ve ACE inhibisyonu için inaktif olan bu peptitlerin hidroliz ile aktive edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Yine süt proteinleri ile yapılan başka bir çalışmada ise süt proteinlerinin hidroliz öncesi %20-60 arasında ACE inhibisyon etkisi olduğu belirtilmiştir (Otte vd, 2007).

Çalışmada hem tripsin ve hem de pepsin hidrolizatlarında %İNH değeri ilk 60 dak içerisinde maksimum değerine ulaşmıştır. Bu durum Chiang vd (2005) tarafından çalışma ile uyumlu olduğu görülmüştür. Soya proteinin farklı enzimlerle hidrolizinin yapıldığı çalışmada bütün enzimlerin ACE inhibisyon aktivitelerinin 30-60 dak arasında maksimum seviyeye çıktığı gözlemlenmiştir. Benzer olarak, Cha ve

Park (2005) tarafından yapılan çalışmada da hidroliz sũresini uzatmanın ACE inhibisyonu üzerine etkisinin olmadığı belirtilmiştir.

Çalışmada 2 saatlik hidroliz sonunda pepsin hidrolizatlarında %İNH değerinin %98 ve üzeri olduğu, tripsin hidrolizatlarının ise %92 civarında olduğu anlaşılmıştır. Sũt proteini ile yapılan bir çalışmada tripsin hidrolizin 3.saatinde %85-90 seviyesinde olan %İNH değeri 6. saatten itibaren sabit kalmış ve 24 saatlik hidroliz sonunda %94 değerine ulaşmıştır. Aynı proteinin pepsin hidrolizi sonucu 3 saatte %70 civarında olan %İNH değeri sũrekli artarak 24 saat sonunda %90'ın üzerine çıkmıştır (Otte vd, 2007). Yapılan başka bir çalışmada, mide enzimiyle hidroliz edilen soya proteinin 2 saat sonrasında ACE inhibisyon değerinde bir değişme olmadığı ve IC50 değerinin 0.048 mg/ml değerinde sabit kaldığı gũzlemlenmiřtir [Cha ve Park, 2005]

Çalışmada hem tripsin hem de pepsin hidrolizi sũresince protein miktarında bir artış gũrũlmũřtũr. P0 rneğinde 24,81 mg/mL olan protein içeriği P120 rneğinde 29,03 mg/mL'e çıkarken, T0 rneğinde 27,43 mg/mL olan protein içeriği T120 rneğinde 30,79 mg/mL değerine çıkmıştır. Kim vd, (2004) tarafından yapılan bir çalışmada mısır gluteni flavorzim enzimiyle 8 saat boyunca hidroliz edilmiş ve hidrolizattaki protein miktarının hidroliz sũresince arttığı gũzlemlenmiř ve IC50 ile protein miktarı arasında doğrusal bir orantı bulunmuş, inhibisyon aktivitesinin protein miktarının artışıyla arttığı anlaşılmıştır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, yağı alındıktan sonra izoelektrik çöktürme yöntemiyle saflaştırılmış tımbul iç fındık izolatu 2 farklı enzimle hidroliz edilmiş ve hidrolizatların ACE inhibisyon etkileri incelenmiştir. Hidroliz süresince farklı zamanlarda alınan hidrolizat örneklerinin IC50 değerleri bulunmuştur. Pepsin hidrolizinin 120.dakikasında alınan örneğin 0,26 mg protein/ml konsantrasyonu ACE'yi %50 oranında engelleyebilirken bu değer T120 hidrolizatında 0,54 mg protein/ml olarak gerçekleşmiştir. Sonuçlar ışığında hem pepsin hem de tripsin hidrolizatlarının iyi bir ACE inhibitörü oldukları anlaşılmıştır. Pepsin ve tripsin hidrolizatları birbirleri ile karşılaştırıldığında pepsin hidrolizi ile elde edilen hidrolizatların ACE'nin çalışmasını tripsin hidrolizatlarına göre yaklaşık 2 kat daha fazla engellediği görülmüştür.

Çalışmada her iki hidroliz uygulamasında da ilk 30 dakikadan sonra IC50 değerlerinde dikkate değer bir değişiklik gözlenmemiştir. Bundan sonra yapılacak benzer çalışmalarda hidroliz süresinin kısaltılması uygun olacaktır.

Bu çalışma fındığın ACE inhibisyon etkisinin araştırıldığı ilk çalışmalardan birisidir. Fındık izolatu'nun hidroliz işleminden önce bile %80'lerin üzerinde olan %İNH değeri düşünüldüğünde bu çalışmanın gelecekte farklı enzimler kullanılarak ve kinetik çalışmalar ışığında tekrarlanması uygun olacaktır. Yine gelecekte yapılacak çalışmalarda hidroliz işlemi sonucu uygulanacak ultrafiltrasyon gibi çeşitli uygulamalarla ACE inhibisyon etkisinin en yüksek olduğu peptit bölümü elde edilebilir. Hidroliz çalışması sonucu elde edilecek hidrolizattaki peptit bölümleri özellikle farmakolojik çalışmalarda değerlendirilebilir ve bu kapsamda canlı doku ve kobay hayvanları ile çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

- AACC. “Approved Methods of the American Association of Cereal Chemist” 10 ed., The Association: St. Paul, MN, Method N: 46.12, (2000).
- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T., “Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion” J. Dairy Sci. 81: 3131-3138, (1998).
- Alasalvar, C., Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C., Ohshima, T., Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 1. Composition characteristics, J. Agric. Food Chem, 51, 3790–3796, (2003)
- ADA (American Dietetic Association), “Position of the American Dietetic Association: functional foods”, J. Am. Diet. Assoc. 99: 1278–1285, (2009)
- Akseki, U., “Dünya Fındık Talebinin Ekonometrik Analizi: Panel Veri Analizi (1970–2010)”, Ege Strategic Research Journal, Cilt 5, Sayı 6: 65-78, (2014)
- Altun M., elik S., Güçlü K., Özyürek M., Erağ E., Apak M., Total Antioxidant Capacity And Phenolic Contents Of Turkish Hazelnut (*Corylus Avellana* L.) Kernels And Oils, Journal of Food Biochemistry, 37: 53-61, (2013)
- Aluko, R.E., Monu, A, “Functional and Bioactive Properties of Quinoa Seed Protein Hydrolysates”, J Food Science, 68:1254-1258, (2003)
- Appel, L.J, Sacks, F.M, Carey, V.J., Obarzanek, E., Swain, J.F., Miller, E.R., “Effects of protein, monounsaturated fat, and carbohydrate intake on blood pressure and serum lipids: results of the OmniHeart randomized trial”. JAMA, 294:2455–64, (2005)

- Appel, L.J, Moore, T.J, Obarzanek, E., Vollmer, W.M., Svetkey, L.P., Sacks, F.M., Bray, G.A., Vogt, T.M., Cutler, J.A., Windhauser, M.M., Lin, P.H., Karanja, N., “A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure”. DASH Collaborative Research Group. N Engl J Med, 17;336(16):1117-24, (1997)
- Aydemir, L.Y., Gökbulut, A.A., Baran, Y., Yemenicioğlu, A., “Bioactive, functional and edible film-forming properties of isolated hazelnut (*Corylus avellana* L.) meal proteins”, Food Hydrocolloids 36; 130-142 (2014)
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribereau, S., Mondor, M., Farnworth, E. And Rajamohamed, S. H., “Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques”, Food Research International, 43: 537 546, (2010).
- Boyacıoğlu D., “Yeni bir araştırma alanı:Fonksiyonel gıdalar”, Dünya Gıda 9 (2): 38-39, (2004)
- Bruice, P. Y., “The Four Stages of Catabolism”, http://chemwiki.ucdavis.edu/Textbook_Maps/Organic_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Bruice_6ed_%22Organic_Chemistry%22/26%3A_The_Organic_Chemistry_of_Metabolic_Pathways/26.05%3A_The_Four_Stages_of_Catabolism, (14.01.2016)
- Cha, M., Park, J. R., “Production and Characterization of a Soy Protein-Derived Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Hydrolysate”, J Med Food 8 (3):305–310, (2005)
- Chabanc, B., Jolles, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L., “Characterization of an antithrombotic peptide from kappacasein in newborn plasma after milk ingestion”, Br. J. Nutr., 73: 583–90 (1995)

- Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Nokihara, K., “Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein”, *J Agric. Food. Chem.*, 44:2619–23, (1996)
- Chiang,, W., Tsou, M., Tsai, Z., Tsai, T., “Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor”, *Food Chemistry*, 98:725–732, (2006)
- DENİZ, E., “FINDIK Sektör Raporu-2009”, <http://www.blacksea-een.org>, (14.01.2016)
- Doğan, G., Bircan, R., “Balık yemlerinde alternatif bitkisel protein kaynağı olarak fındık küspesi kullanımı”, *MAKUFEBED 2*: 49 -57, (2010)
- Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T., Shah N.P., Probiotic Strains as Starter Cultures Improve Angiotensin-converting Enzyme Inhibitory Activity in Soy Yogurt, ol. 70, *Journal of Food Science*, 8: 87-94, (2005)
- Erbaş, M., “Yeni Bir Gıda Grubu Olarak Fonksiyonel Gıdalar”, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, 24-26 Mayıs 2006, Bolu, 791-794, (2006).
- Erdmann, K., Cheung, B. W. Y., Schröder, H., “The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19: 643–654 (2008).
- Fiat, A.M., Levy-Toledano, S., Caen, J.P., Jolles, P., “Biologically active peptides of casein and lactotransferrin implicated in platelet function”. *J. Dairy. Res.* 56:351–5, (1989)
- Fitzgerald, R.J., Meisel, H., “Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme”, *Br . J. Nutr* , 84: 33-37 (2000).

FitzGerald, R.J., Murray, B.A., Bioactive peptites and lactic fermentations. International Journal of Dairy Technology, 59: 118-125, (2006)

FitzGerald, R.J., Murray, B.A., Walsh, D.J “Hypotensive peptites from milk proteins”, J. Nutr., 134; 980–988 (2004)

Fujita, H., Yokoyama, K., Yoshikawa, M., “Anti-hypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously rats (SHR)”, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology,1:304–305 (1995).

Gao, D., Chang, T., Li, H., Cao, Y., “Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from cottonseed protein hydrolysate” African Journal of Biotechnology, 9(53): 8977-8983, (2010).

Gönşüoğlu, N., Gökmen, V., “Bioactive compounds in different hazelnut varieties and their skins”, Journal of Food Composition and Analysis, 43: 203–208 (2015)

Grundy, S.M., Balady, G.J., Criqui, M.H., Fletcher, G., Greenland, P., Hiratzka, L.F., “Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction American HeartAssociation”, Circulation, 97:1876–87 (1998)

GTB, Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü, “2014 Yılı Fındık Raporu” Şubat 2015, ANKARA

Hartmann, R., Miesel, H., “Food-derived peptites with biological activity: from research to food applications”, Curr Opin Biotechnol, 18(2):163-9 (2007)

Hasler, C.M. Functional foods(Benefits, concerns and challenges—A position paper from the American Council on Science and Health) . J Nutr., 132:3772–3781, (2002)

- Holub, B. J., “Potential for functional food ingredients to reduce health care costs”, International Food and Health Innovation Conference, Malmo, Sweden, October 25-27, (2006).
- Iritani, N., Nagashima, K., Fukuda, H., Katsurada, A., Tanaka, T., “Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver”, J. Nutr., 116:190–7 (1986)
- Kayalak, S., Özçelik, A., “Türkiye’de Ve Dünyada Fındık Politikaları Tarım”, Ekonomisi Dergisi; 18(2) : 43 – 53, (2012)
- Kiziltan, A., Yalçın, H., Türkiye’de Fındık Sektöründe Üreticilerin Sorunları : Samsun İlinde Bir Uygulama, Atatürk Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Dergisi, 24(4): 79-98, (2010)
- Kim, S. K., Choi, Y. R., Park, P. J., Choi, J. H., Moon, S.H., “Screening of biofunctional peptides from cod processing wastes” Journal of the Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology, 43: 225–227, (2000).
- Kim, J.M., Whang, J.H., Joo, H., “Enhancement of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity and improvement of the emulsifying and foaming properties of corn gluten hydrolysate using ultrafiltration membranes”, Eur Food Res Technol, 218:133–138, (2004)
- Kim, S.K., Wijesekara I., “Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review”, J Funct Foods, 2:1–9 (2010).
- Kitts, D.D., Weiler, K., “Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery”, Curr. Pharm. Des., 9:1309–23, (2003)
- Kong, X., Zhou, H., Qian, H., “Enzymatic preparation and functional properties of wheat 3 gluten hydrolysates”, Food Chemist, 10: 615–620, (2006)

- Köksal, A.İ. Artık, N., Şimşek, A., Güneş, N., “Nutrient composition of hazelnut (Corylus avellana L.) varieties cultivated in Turkey”, *Food Chemistry*, 99: 509–515, (2006)
- Li C.H., Matsui T. , Matsumoto, K., Yamasaki, R., Kawasaki, T., “Latent production of angiotensin I–converting enzyme inhibitors from buckwheat protein” *J. Pept. Sci.*, 8: 267-274 (2002).
- Li, G.H., Le, G.W., Shi, Y.H., Shrestha, S., “Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects”, *Nutr Res*, 24:469-486, (2004)
- Miyoshi, S., Kaneko, T., Yoshizawa, Y., Fukui, F., Tanaka, H., Maruyama, S. “Hypotensive activity of enzymatic a-zein hydrolysate. *Agricultural and Biological Chemistry*”, 55: 1407–1408, (1991).
- Moure, A., Dominguez, H., Zuniga, M. E., Soto, C., Chamy, R., “Characterisation of protein concentrates from pressed cakes of Guevina avellana Chilean hazelnut”, *Food Chemistry*, 78(2): 179-186, (2002)
- Otte, J., Shalaby, S.M., Zakora, M., Pripp, A.H., El-Shabrawy, S.A., “Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis”, *International Dairy Journal*, 17:488–503, (2007)
- Öztop, K.,. “Fındık Proteini Konsantresinin Fonksiyonel Özelliklerinin İncelenmesi”, *Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi*, (2014)
- Özdemir, F., Akinci, I., Physical and nutritional properties of four major commercial Turkish hazelnut varieties. *J. Food Eng.* 63, 341-347, (2004)

Özdemir, F., Topuz, A., Doğan, Ü., Karkacier, M., “Fındık çeşitlerinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri”, *Gıda*, 23(1): 37-41, (1998)

Özdemir, M., Ackurt, F., Kaplan, M., Yıldız, M., Loker, M., Gürcan, T., Biringen, G., Okay, A., Seyhan, F. G., “Evaluation of New Turkish Hybrid Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Varieties: Fatty Acid Composition, α -Tocopherol Content, Mineral Composition and Stability,” *Food Chemistry*, 73: 411-415, (2001)

Parrot, S., Degraeve, P., Curia, C., Martial-Gros, A., In vitro study on digestion of peptites in Emmental cheese: Analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptites, *Nahrung/ Food*, 47:87–94, (2003)

Pedroche, J., Yust, M., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Millan, F., Vioque, V., “Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptites with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity”, *J Sci Food Agric*, 82:960–5, (2002)

Pelvan, E., Alasalvar, C., Uzman, S., “Effects of Roasting on the Antioxidant Status and Phenolic Profiles of Commercial Turkish Hazelnut Varieties (*Corylus avellana* L.)”, *J. Agric.Food Chem.*, 60: 1218–1223, (2012)

Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., Kawakishi, S., “The contribution of plant food antioxidants to human health”, *Trends Food Sci. Technol*, 6: 75-82, (1995)

Samur, G., Yıldız, E., “Obezite ve kardiyovasküler hastalıklar / hipertansiyon”, Sağlık Bakanlığı Yayınları, No: 729, (2008)

Sanders, M.E., “Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria”, *Dairy and Food Culture Technologies*, 8: 341-347, (1998)

- Savoie, L., Agudelo, R. A., Gauthier, S. F., Marin, J., Pouliot, Y., “In vitro determination of the release kinetics of peptides and free amino acids during the digestion of food proteins”, *Journal of AOAC International*, 88(3): 935-948, (2005).
- Selcuk, Y., “ACE inhibitörleri ve angiotensin II reseptör blokerleri”, IV. Ulusal Hipertansiyon ve 13 Böbrek Hastalıkları Kongresi, 12-16, (2002)
- Seyhan, F., Ozay, G., Saklar, S., Ertas, , E., Satir, G., Alasalvar, C., “Chemical changes of three native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) during fruit development”, *Food Chem*, 105: 590–596, (2007)
- Shahidi, F., “Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods”, *Trends in Food Science and Technology* 20: 376-387, (2009)
- Sheih, C., Fang, T. J., Wu, T., “Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste” *Food Chemistry* 115: 279–284, (2009).
- Steinbrecher, U.P., Zhang, H.F., Loughheed, M., “Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis”, *Free Radic Biol Med*, 9: 155–68, (1990)
- Suetsuna, K., Chen, J.R. “Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*” *Mar Biotech*, 3(4):305-309, (2001).
- Suetsuna, K., “Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic)”, *J .Nutr. Biochem*, 9:415-419, (1998).

Sugiyama, K., Takada, K., Egawa, M., Yamamoto, I., Onzaka, H., Oba, K. “Hypotensive effect of fish protein hydrolysate”, Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science, 65:35–43, (1991)

Şanlıdere, H., Öner, Z., “Süt Ürünlerinde Bulunan Biyoaktif Peptitler ve Fonksiyonları”, Gıda Dergisi, Sayı:6, 311-317, (2006).

Turgut, S., “Anjiotensin dönüştürücü enzim ve I/D polimorfizmi”, S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 12(4):53-57, (2005)

TMO (Toprak Mahsulleri Ofisi), “Ham Fındık Yağı Ve Fındık KÜşpesi Satışları”, , <http://www.tmo.gov.tr/main.aspx?ID=327> ,(02.09.2015)

Van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D.B.A., Voragen, A.G.J., “Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology”, International Dairy Journal, 12: 813–820, (2002)

Wergedahl, H., Liaset, B., Gudbrandsen, O.A., Lied, E., Espe, M., Muna, Z., “Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats”. J. Nutr. 134:1320–7, (2004)

Boudless, “Chemical digestion is the process of breakdown of large macronutrients into smaller molecules by enzyme-mediated hydrolysis”, <https://www.boundless.com/physiology/textbooks/boundless-anatomy-and-physiology-textbook/the-digestive-system-23/chemical-digestion-224/mechanisms-of-chemical-digestion-1103-8914/> , (14.01.2016)

Williams, G.H., “Converting-enzyme inhibitors in the treatment of hypertension” N. Engl. J. Med., 319:1517-1525, (1988),

Wu,J., Ding, X., “Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides”, Food Research International, 35: 367–375, (2002)

Yağcı, S., Gğs, F., “Response surface methodology for evaluation of physical and functional properties of extruded snack foods developed from food-by-products”, Journal of Food Engineering, 86:122-132 (2008)

Yalçın, S., Őehu A., etinkaya N., “Fındık kspesti ve fındık ii kabuğunun rumende paralanma zellikleri”, Ankara niv. Vet. Fak. Derg., 45: 115-122 (1998)

Yurttas., H.C., Schafer, H.W. And Warthesen, J.J., Antioxidant activity of nontocopherol hazelnut (Co r y lus spp.) phenolics. J. Food Sci. 65:276–280, (2000)

Yust, M.M., Pedroche, J., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Millan, F., and Vioque, J., Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase, Food Chemistry 81:363–369, (2003)

Ycesan, F.B., rem, A., Kural, B.V., rem, C. Turan, I., Hazelnut consumption decreases the susceptibility of LDL to oxidation, plasma oxidized LDL level and increases the ratio of large/small LDL in normolipitemic healthy subjects. Anadolu Kardiyol. Derg. 10: 28–35, (2010)

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Evren ağlar EROĞLU

Doğum Tarihi: 17/02/1974

Öğrenim Durumu:

| Derece | Bölüm/Program | Üniversite | Yıl |
|---------------|-------------------|-------------------------------|-----------|
| Lisans | Gıda Mühendisliği | Orta Doğu Teknik Üniversitesi | 1997-2000 |
| Yüksek Lisans | Gıda Mühendisliği | Mersin Üniversitesi | 2012- |

(Varsa) Görevler:

| Görev Unvanı | Görev Yeri | Yıl |
|---------------------|---|-----------|
| Araştırma Görevlisi | Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü | 2001-2003 |
| Gıda Denetçisi | Ankara Tarım İl Müdürlüğü | 2004-2007 |
| Araştırmacı | TAGEM Toprak ve Su Kaynakları Araştırma Enstitüsü | 2007-2011 |
| Araştırmacı | TAGEM Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü | 2011- |