

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

**YAĞI ALINMIŞ FINDIK POSALARININ TRİPSİN,
KİMOTRİPSİN VE TERMOLİSİN ENZİMLERİ İLE
MUAMELE EDİLMESİ SONUCU OLUŞAN BAZI
BİYOAKTİF PEPTİTLERİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahmet Furkan ÇAĞLAR

İstanbul Kasım, 2019

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**YAĞI ALINMIŞ FINDIK POSALARININ TRİPSİN,
KİMOTRİPSİN VE TERMOLİSİN ENZİMLERİ İLE MUAMELE
EDİLMESİ SONUCU OLUŞAN BAZI BİYOAKTİF
PEPTİTLERİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahmet Furkan ÇAĞLAR

Tez Danışmanı

Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

İstanbul Kasım, 2019

TEZ ONAYI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

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

Danışman

Doç. Dr. Üyesi İbrahim GÜLSEREN



Üye

Prof. Dr. Hasan YETİM



Üye

Dr. Öğr. Üyesi Halime PEHLİVANOĞLU



Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Ahmet Korhan BİNARK

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “Fındık Posalarının Tripsin, Kimotripsin ve Termolisin Enzimleri ile Muamele Edilmesi Sonucu Oluşan Antihipertansif, Antidiyabetik ve Antioksidatif Peptitlerin Belirlenmesi” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.



Ahmet Furkan ÇAĞLAR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde bana yol gösteren, çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesi aşamalarında katkılarını esirgemeyen değerli tez danışmanım Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN'e, çalışmam sırasında her konuda yardımını aldığım Bilal ÇAKIR'a,

Türkiye TÜBİTAK 1001 Programı 217O063 numaralı proje kapsamında hazırlanan tezimde finansal desteği sağlayan TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı'na,

Acıbadem Üniversitesi Labmed'de gerçekleştirilen MS analizlerinde (hizmet alımı) teknik destekleri için Prof. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL ve Emel AKGÜN'e,

Eğitim hayatım boyunca bilgisiyle beni aydınlatan, maddi manevi desteklerini esirgemeyen babam Abdullah ÇAĞLAR'a, dualarını üzerimden hiç eksik etmeyen annem Neziha ÇAĞLAR'a, her zaman yardıma koşan abim Muhammed Yusuf ÇAĞLAR'a ve küçük kardeşim Mahmut Sefa ÇAĞLAR'a, her türlü desteğiyle yanımda olan, eşim Nagihan ÇAĞLAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ahmet Furkan ÇAĞLAR

İstanbul- 2019

ÖZET

YAĞI ALINMIŞ FINDIK POSALARININ TRİPSİN, KİMOTRİPSİN VE TERMOLİSİN ENZİMLERİ İLE MUAMELE EDİLMESİ SONUCU OLUŞAN BAZI BİYOAKTİF PEPTİTLERİN BELİRLENMESİ

Ahmet Furkan ÇAĞLAR

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği

Tez danışmanı: Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Kasım-2019, 130 Sayfa

Ülkemizde dolaşım sistemi hastalıkları ölüm olaylarının birincil nedenidir. Dolaşım sistemi hastalıklarının risk faktörleri arasında da hipertansiyon ve diyabet tedavisinde kullanılan ACE ve DPP-IV inhibitörlerinin önemli rolü bulunmaktadır. Bu inhibitörlerin milli bir ham maddemizden üretilmesi toplumumuz için yararlı bir yaklaşım olacaktır. Bu çalışmanın amacı, ülkemiz için ekonomik öneme sahip Giresun tombul fındık posasından proteoliz, fraksiyonlama, LC-MS/MS ve uygun *in silico* teknikler kullanılarak antihipertansif, antidiyabetik ve antioksidatif peptitler tanımlamak ve bunların çeşitli özelliklerini (fizikokimyasal, biyoaktif) belirlemektir.

Alkali ekstraksiyonu-izoelektrik çöktürme yöntemiyle fındık posalarından konsantre edilmiş proteinler, 3 farklı enzimle (tripsin, kimotripsin ve termolisin) hidroliz edilmiştir. Sonrasında bu hidrolizatlardan anyon değişimi yöntemleri ile fraksiyonlar elde edilmiş ve bu fraksiyonlarda çeşitli aktivite (ACE, DPP-IV ve antioksidatif) testleri yapılmıştır. Daha sonra da ACE inhibisyonu ve DPP-IV inhibisyonu aktivitesi gösteren fraksiyonlar LC-MS/MS analiz teknikleriyle incelenerek peptit dizilimleri belirlenmiştir. Bu peptitlerin, bazı fizikokimyasal ve biyoaktif özellikleri, literatürde bulunan *in silico* yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Aktiviteleri *in silico* tekniklerce doğrulanan peptitlerin arasından (PeptideRanker değerine göre) en yüksek aktiviteye sahip olanlar seçilmiş ve inhibisyon mekanizması yine *in silico* teknikler kullanılarak incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre fraksiyonlarda en yüksek aktivite değerleri 3 hidrolizatta da (tripsin, kimotripsin ve termolisin) yapılan ACE testlerinde görülmüştür. Bunun

yanı sıra DPP-IV önleyici ve antioksidan aktivite testlerinde çok sayıda fraksiyonda aktivite gözlenmiş ancak aktivite değerleri nispeten düşük bulunmuştur. Uygun LC-MS/MS ve *in silico* yöntemler kullanılarak ACE aktif fraksiyonlarda 192 adet ve DPP-IV aktif fraksiyonlarda ise 14 adet peptit belirlenmiştir. DPP-IV inhibisyonu gösteren peptitler arasında YDLDFK triptik peptidinin DPP-IV üzerinde 10 muhtemel bağlanma noktasına sahip olduğu bulunmuştur. Farklı enzimlerle muamele sonucu oluşan SPLAGR (tripsin), VPHW (kimotripsin) ve PGHF (termolisin) peptitlerinin, ACE üzerinde sırasıyla 16, 10 ve 11 muhtemel bağlanma noktalarına sahip oldukları bulunmuştur.

Yapılan çalışmada belirlenen aktif peptitler, gelecekte farmakolojik çalışmalara konu edilebilir veya kontrolsüzce tüketilebilen gıdalarda fonksiyonel bileşik olarak kullanılabilirliği değerlendirilebilir. Bu sayede hipertansiyon ve diyabetle mücadelede önemli katkılar sağlayabilmesi mümkün olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Fındık, ACE inhibisyonu, DPP-IV inhibisyonu, tripsin, kimotripsin, termolisin, biyoaktif peptit, antidiyabetik aktivite, antihipertansif aktivite, antioksidatif aktivite, inhibisyon mekanizması

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME BIOACTIVE PEPTIDES FORMED BY TREATMENT OF DEGREASED HAZELNUT PULPS WITH TRYPSIN, CHYMOTRYPSIN AND THERMOLYSIN ENZYMES

Ahmet Furkan ÇAĞLAR

Master of Science, Food Engineering

Supervisor: Dr. İbrahim GÜLSEREN

November-2019, 130 Pages

Cardiovascular system diseases are the leading cause of fatalities in Turkey. ACE and DPP-IV inhibitors play an important role in the treatment of hypertension and diabetes, which are among the risk factors of cardiovascular system diseases. The production of these inhibitors from a national raw material would be a useful approach for our society. The aim of this study was to identify antihypertensive, antidiabetic and antioxidative peptides using proteolysis, fractionation and LC / MS-MS techniques from the pulp of Turkish Tombul hazelnut. It is also to evaluate the physicochemical and bioactive properties of these peptides using *in silico* techniques.

In the reserch, concentrated proteins from hazelnut pulps were hydrolyzed with 3 different proteolytic enzymes (trypsin, chymotrypsin and thermolysin). Then, anion exchange based fractions were obtained from hydrolysates and various activities (ACE, DPP-IV and antioxidative) tests were performed in these fractions. The fractions with ACE inhibition and DPP-IV inhibition activity were examined by LC / MS-MS analysis techniques and peptide sequences were determined. Physicochemical properties and bioactive properties of these peptides were evaluated using *in silico* methods. Among the peptides whose activity was confirmed by *in silico* techniques, the ones with the highest activity (according to the PeptideRanker value) were selected and the inhibition mechanism was also examined using *in silico* techniques.

According to the results, the highest activity values were observed in ACE tests in all the hydrolysates (trypsin, chymotrypsin and thermolysin). In addition, DPP-IV inhibitor and antioxidant tests showed activity in many fractions but their activity

values were relatively low. Using the appropriate LC / MS-MS and *in silico* methods, 192 ACE active and 14 DPP-IV active peptides were determined. Among the active peptides showing DPP-IV inhibition, the YDLDFK tryptic peptide had 10 possible binding sites on DPP-IV. SPLAGR (trypsin), VPHW (chymotrypsin) and PGHF (thermolysin) peptides formed by treatment with different enzymes had 16, 10 and 11 possible binding sites on ACE, respectively.

Active peptides identified in the study, may be subject to future pharmacological studies or its use as functional compound in foods that can be consumed uncontrolled. Thus, it will be possible to make important contributions in the struggle against hypertension and diabetes.

Keywords: Hazelnut, ACE inhibition, DPP-IV inhibition, trypsin, chymotrypsin, thermolysin, bioactive peptide, antidiabetic activity, antihypertensive activity, antioxidative activity, inhibition mechanism

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
GİRİŞ	1
BİRİNCİ BÖLÜM	3
LİTERATÜR TARAMASI	3
1.1. Amino asitler	3
1.2. Peptitler	5
1.3. Biyoaktif peptitler.....	6
1.3.1. Antihipertansif peptitler	7
1.3.2. Antidiyabetik peptitler	9
1.3.3. Antioksidatif peptitler	10
1.4. Protein ve peptitlerin saflaştırılmasında kullanılan kromatografik yöntemler 12	
1.4.1. Afinite kromatografisi	12
1.4.2. Jel filtrasyon kromatografisi	13
1.4.3. İyon değişim kromatografisi	14
1.4.4. Hidrofobik etkileşim kromatografisi.....	15
1.4.5. Ters faz kromatografisi	16
1.5. Fındık.....	16
1.5.1. Fındık proteinleri.....	20

1.5.2. Çalışmada fındık proteinlerinin hidrolizi amacıyla kullanılan enzimler

21

İKİNCİ BÖLÜM 23

MATERYAL VE METOT 23

2.1. Materyaller 23

2.2. Metot 23

2.2.1. Bitkisel posalardan protein konsantrelerinin üretilmesi..... 23

2.2.2. Protein konsantrelerinin proteolitik hidrolizi 23

2.2.3. TNBS yöntemi ile hidroliz derecesinin belirlenmesi 24

2.2.4. Peptitlerin fraksiyonlara ayrılması 25

2.2.5. ACE-önleyici aktivite testleri..... 26

2.2.6. DPP-IV önleyici aktivite testleri 27

2.2.7. Demir şelasyon aktivitesi testi 27

2.2.8. Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi 28

2.2.9. Superoksit anyon tutma aktivitesi testi 29

2.2.10. Peptitlerin tanımlanması..... 30

2.2.11. ACE ve DPP-IV aktif fraksiyonların özelliklerinin değerlendirilmesi

31

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM 32

BULGULAR VE TARTIŞMA 32

3.1. Hidroliz derecesi..... 32

3.2. Peptit numunelerinin anyon değişimi yöntemi ile fraksiyonlanması 33

3.3. ACE-önleyici aktivite..... 44

3.4. DPP-IV önleyici aktivite 46

3.5. Antioksidatif aktivite testleri 49

3.5.1. Demir şelasyon aktivitesi 49

3.5.2. Hidroksil radikali tutma aktivitesi..... 51

3.5.3. Süperoksit anyon tutma aktivitesi	52
3.6. ACE aktif fraksiyonların LC-MS/MS analizi ve <i>in silico</i> yöntemlerle değerlendirilmesi.....	54
3.7. DPP-IV aktif fraksiyonların LC-MS/MS analizi ve <i>in silico</i> yöntemlerle değerlendirilmesi.....	63
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	67
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKÇA	69
EKLER.....	79
ÖZGEÇMİŞ.....	113

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1: Standart amino asitler ve kısaltılmış adları.....	5
Tablo 1.2: İyon değişim ligandları ve fonksiyonel grupları.....	15
Tablo 1.3: Türkiye'nin 2017 fındık ihracatı rakamları.	18
Tablo 1.4: Türkiye'de yetiştirilen farklı fındık çeşitlerine ait nem, yağ, kül, protein miktarları.	19
Tablo 3.1: Her bir hidrolizat için en etkin (PeptideRanker değerine göre) peptit sekansları.....	57
Tablo 3.2: SPLAGR peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi.....	61
Tablo 3.3: VPHW peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi.....	61
Tablo 3.4: PGHF peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi.....	61
Tablo 3.5: Mevcut peptitlerin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi ve bu listelerin VPP peptidine ait liste ile kıyaslanması. ..	62
Tablo 3.6: YDLDFK peptidinin DPP-IV ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi.....	65
Tablo 4.1: Triptik ACE aktif fındık peptitlerin, fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri.	79
Tablo 4.2: Kimotriptik ACE aktif fındık peptitlerin, fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri.	90
Tablo 4.3: Termolisin muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin, fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri.	92
Tablo 4.4: Kimotriptik DPP-IV aktif fındık peptitlerin, fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri.	110
Tablo 4.5: Triptik DPP-IV aktif fındık peptitlerin, fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri.	111

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: Amino asitlerin genel yapısı	3
Şekil 1.2: Amino asitlerin R grubuna bağlı sınıflandırılması	4
Şekil 1.3: Peptit bağı oluşumu	5
Şekil 3.1: TNBS yöntemiyle belirlenen, çeşitli proteazlar tarafından hidrolize edilmiş findık posası proteinlerinin hidroliz derecesi.....	32
Şekil 3.2: Hidrolizat örneklerinin 20 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak 1 ve 5 ml yatak hacimli Capto-Q anyon değişim kolonunda fraksiyonlanması	34
Şekil 3.3: Hidrolizat örneklerinin 100 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak 5 ml yatak hacimli Capto-Q anyon değişim kolonunda fraksiyonlanması	41
Şekil 3.4: ACE testi HPLC kromotogramı	44
Şekil 3.5: Çeşitli proteazlar tarafından hidrolize edilmiş findık posası peptit fraksiyonları için ACE inhibisyon aktivitesi.....	45
Şekil 3.6: DPP-IV inhibisyonu karşılaştırması için örnek spektrum.	47
Şekil 3.7: Hidrolizat fraksiyonlarının % DPP-IV inhibisyonu	48
Şekil 3.8: Çeşitli proteazlar tarafından hidrolize edilmiş findık hidrolizatlarının % şelatlanma kapasitesi.....	50
Şekil 3.9: Çeşitli proteazlar tarafından hidrolize edilmiş findık peptit fraksiyonlarının hidroksil radikali tutma aktivitesi.....	51
Şekil 3.10: Çeşitli proteazlar tarafından hidroliz edilmiş findık peptit fraksiyonlarının süperoksit anyon tutma aktivitesi.....	52
Şekil 3.11: C2 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri.....	55
Şekil 3.12: E2 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri.....	55
Şekil 3.13: T3 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri.....	55
Şekil 3.14: Triptik peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan SPLAGR peptitinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi.....	58
Şekil 3.15: Kimotriptik peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan VPHW peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi	59
Şekil 3.16: Termolisin muamelesi ile hazırlanan peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan PGHF peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi	60
Şekil 3.17: C10 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri.....	64
Şekil 3.18: T12 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri.....	64

Şekil 3.19: DPP-IV inhibisyon parametreleri bulunan DPP-IV inhibitörü peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan YDLDFK peptitinin, DPP-IV ile etkileşiminin şematize edilmesi 66



KISALTMALAR LİSTESİ

μg : mikrogram

μL : mikrolitre

μM : mikromolar

mg: miligram

mL: mililitre

mM: milimolar

M: molar

M.A.: moleküler ağırlık

g: gram

HCl: hidroklorik asit

TCA: trikloroasetik asit

TFA: trifluoroasetik asit

TBA: tiobarbutirik asit

TNBS: trinitrobenzensülfonik asit

ACE: Angiotensin-I dönüştürücü enzim

DPP-IV: Dipeptidil peptidaz-4

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografi

FPLC: Hızlı protein sıvı kromatografisi

IC₅₀: %50 inhibisyon için gerekli konsantrasyon

NaOH: Sodyum hidroksit

pH: Hidrojen iyonu gücü (Power of Hydrogen)

vd.: ve diğerleri

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization- WHO), kalp hastalıkları ve kalp krizine bağlı ölümlerin 2020 yılı itibarı ile dünyadaki ölüm olaylarının en sık görülen sebebi olacağı öngörüsünü yapmaktadır (Erdmann vd., 2008). Türkiye’de 2017 ve 2018 yılı verilerine göre tüm ölüm olayları arasında koroner kalp hastalıkları ilk sırada yer almaktadır (TÜİK, 2019). Diyabet ve hipertansiyon, genellikle birlikte görülen ve yaygınlık oranı yüksek iki hastalık grubudur. Ülkemizde yaklaşık olarak erişkin her 3 kişiden 1’inde hipertansiyon vardır (Sağlam vd., 2008). Tip-2 diyabet sıklığı da ülkemizde alarm verici bir artış hızı göstermektedir (Onat vd., 2013). Türkiye’de 2008-2012 yılları arasında diyabetli kişi sayısı yaklaşık olarak %107 artmıştır. Ülkemizde diyabetin toplam maliyeti SGK 2012 yılı verilerine göre yaklaşık 10 milyar TL olmuştur. Yine diyabetin, sağlık harcamalarının toplam maliyetindeki payı ise %22,6 olarak bulunmuştur (Türkiye Diyabet Programı 2015-2020). Dolayısıyla hipertansiyon ve diyabet gibi risk faktörlerinin yaygınlaşmasının önüne geçmek için alınabilecek tüm tedbirler önem arz etmektedir. Bununla birlikte sentetik ilaçların yan etkileri dolayısıyla daha ucuz ve güvenli alternatif ürünlerin kullanımına yönelik çalışmalar bütün dünyada sürdürülmektedir. Bu bağlamda, hayvan ve bitki kökenli peptitler ile sentetik peptitler alanlarında çalışmalar bulunmaktadır (Hong vd., 2008).

Anjiyotensin I-dönüştürücü enzim (ACE) yoğun olarak glikozidik bağlar içeren, membrana bağlı bir çinko metalloproteazıdır. Bu enzim, anjiyotensin I hormonunu, bir damar daraltıcı (vazokonstriktör) olan anjiyotensin II hormonuna çevirir. Ayrıca bradikinin ismiyle bilinen peptiti de yıkıma uğratarak, bu peptitin damar genişletici (vazodilatör) fonksiyonunu engeller. Bu şekilde, ACE, tansiyonu yükseltir ve kandaki sıvı ve tuz dengesini belirler (Hartmann ve Meisel, 2007; Vermeirssen vd., 2004). Anjiyotensin I-dönüştürücü enzim (ACE) önleyici peptitler, hipertansiyonu düşürme potansiyeli olan biyoaktif peptitlerdir.

Diyabette artmış bir oksidatif stres durumu gözlenmekte ve oksidatif stresin mikro ve makrovasküler komplikasyonlara neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından vurgulanmaktadır. Antioksidanlar, oksidatif stres durumunu kontrol altına alabilir, oksitlenebilir bir substratın oksidasyonunu geciktirebilir veya önleyebilirler. Bu bağlamda antioksidanlar büyük önem kazanmaktadır (Chakrabarti vd., 2014; Li ve Yu, 2015; Ünal vd., 2018; Pisoschi ve Pop, 2015). Anjiyotensin I-dönüştürücü enzim

(ACE) inhibitörleri, hipertansiyon tedavisi ve diyabetik nefropatinin (mikrovasküler bir komplikasyon) engellenmesi amacıyla kullanılmasının yanı sıra bu inhibitörler aynı zamanda antioksidan aktivite gösterebilmektedir. Dolayısıyla diyabet tedavisinde antidiyabetiklere ek olarak antioksidan maddelerin veya antioksidan etkileri bulunan antidiyabetiklerin kullanılması tavsiye edilmektedir (Kedziora-Kornatowska vd.,2000; Memişoğulları,2006; Vincent vd., 2004).

Besin alımının ardından bağırsaktan salgılanan hormonlara inkretin hormonu ve bunların oluşturdukları etkiye de inkretin etkisi denilmektedir. İnkretinler pankreasta glukoz bağımlı insülin salgılanmasını artırırken, glukagon salgılanmasını baskılar. İnkretin hormonlarının, glikoz tehdidine karşı insülin cevabına %70'ten daha fazla katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir (Nauck vd., 2009; Holst ve Gromada, 2014). DPP-IV (EC 3.4.14.5) bağırsak sindirim ve absorpsiyon mekanizmalarında anahtar enzimdir. Bu enzimin aktivitesi inkretinlerin yıkımına neden olmaktadır. Tip -2 diyabetlilerde inkretin hormonlarının bozulmuş salınımının ve hatalı etkilerinin bir kombinasyonu nedeniyle inkretin etkisi azalır. Bu durum kan şekerinin artmasına ve vücut dokularının zarar görmesine neden olur. DPP-IV inhibisyonu, inkretinlerin inaktivasyonunu önler ve aktif oranlarını artırır. Protein hidrolizatlarında DPP-IV'ü *in vitro* inhibe edebilen ve *in vivo* kan glikoz seviyesini düşürebilen biyoaktif peptitlerin varlığı, antidiyabetik aktiviteye sahip peptit üretimini teşvik etmiştir (Ahren, 2007; Barnett, 2006; Mazorra-Manzano vd., 2018).

Grubumuz tarafından yapılan çalışmalarda 23 adet fındık proteini *in silico* yöntemlerle analiz edilmiş ve muhtemel biyoaktif özellikleri incelenmiştir (Gülseren, 2018). Fındık proteinlerinde gözlenecek en muhtemel biyoaktivitelerin ACE ve DPP-IV önleyici aktiviteler olduğu, bu aktiviteler kadar sıklıkla rastlanmasa da fındık proteinlerinin antioksidatif etkileri de olabileceği öngörülmüştür. Bu bulguları göz önüne alarak, ekibimiz kısa bir *in vitro* ön çalışma yürütmüştür (Gülseren, Çakır & Çağlar, 2019). Belirli koşullar altında hazırlanan hidrolizat bir miktar (%10-40) ACE önleyici aktiviteye sahip bulunmuştur. Dolayısıyla, farklı enzimler ve tepkime koşulları kullanılarak fındık proteinlerinin biyoaktivitelerinin iyileştirilmesi ihtimali söz konusudur. Bu varsayım, mevcut çalışmanın ardındaki temel fikirlerden biridir. Dolayısıyla bu çalışmada birden fazla proteaz ve modern fraksiyonlama teknikleri kullanılarak ACE önleyici, DPP-IV önleyici ve antioksidatif etkisi bulunan biyoaktif peptitlerin üretilmesi planlanmıştır.

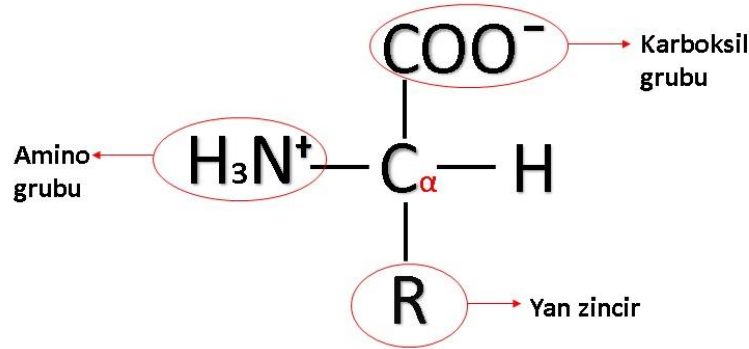
BİRİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR TARAMASI

1.1. Amino asitler

Amino asitler, yapılarında hem amino grubu (NH_2) hem de karboksil grubu (COOH) içerirler. Doğada 300 kadar farklı amino asit bulunmaktadır. Bunların içinden proteinlerin yapısal ünitelerini oluşturan 20 amino asit, standart amino asitler olarak bilinmektedir (Bilişli, 2009).

Standart amino asitler, α -karbon atomuna bağlanmış bir amino grubu ve bir karboksil grubu içerirler. Fizyolojik pH değerinde amino grubu pozitif yüklüdür; karboksil grubu ise negatif yüklüdür. Standart amino asitler, üç harfli kısaltmalar ve tek harfli sembollerle gösterilirler (Altınışık,1998). Standart amino asitlerin kısaltılmış adları Tablo 1.1'de verilmiştir.

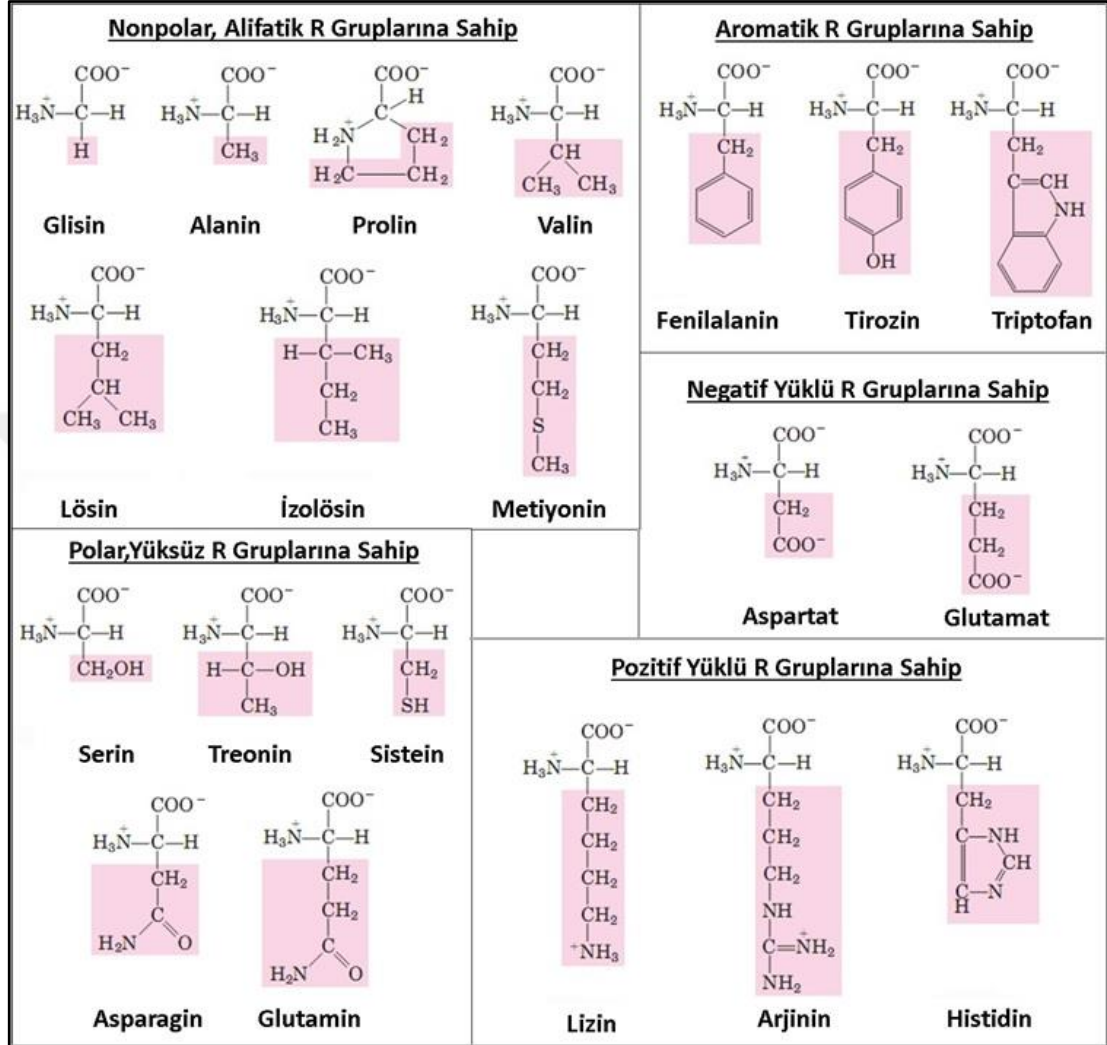


Şekil 1.1: Amino asitlerin genel yapısı

Amino asitlerin özellikleri R grubuna bağlı olarak değişmektedir. Amino asitlerin R gruplarına bağlı sınıflandırılması Şekil 1.2 de verilmiştir.

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

etanolde iyi çözüdür. Amino asitlerin alkolde çözünürlük derecelerinin düşük olması polar özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Bilişli, 2009).



Şekil 1.2: Amino asitlerin R grubuna bağlı sınıflandırılması

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

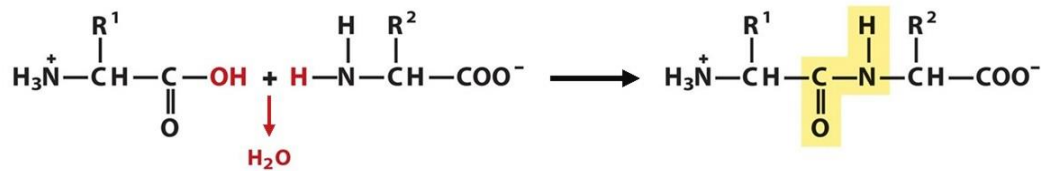
Amino asitler maksimum UV absorpsiyonunu farklı dalga boylarında gösterirler. Aromatik amino asitler 200-230 nm ve 250-290 nm dalga boylarında maksimum UV absorpsiyonunu göstermektedirler. Protein ve peptitlerin tayinlerinde 280 nm’de alınan absorpsiyon değerleri kullanılmaktadır.

Tablo 1.1: Standart amino asitler ve kısaltılmış adları (Altınışık,1998).

AMİNO ASİT ADI	3 HARFLİ KISALTMA	TEK HARFLİ KISALTMA
Glisin	Gly	G
Alanin	Ala	A
Valin	Val	V
Lösin	Leu	L
İzolösin	Ile	I
Metiyonin	Met	M
Fenilalanin	Phe	F
Triptofan	Trp	W
Tirozin	Tyr	Y
Serin	Ser	S
Prolin	Pro	P
Treonin	Thr	T
Sistein	Cys	C
Asparajin	Asn	N
Glutamin	Gln	Q
Aspartat	Asp	D
Glutamat	Glu	E
Lizin	Lys	K
Histidin	His	H
Arjinin	Arg	R

1.2. Peptitler

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



Şekil 1.3: Peptit bağı oluşumu

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

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

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

1.3. Biyoaktif peptitler

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

Peptitlerin biyoaktiviteleri, proteinlerin yapısından koparıldıktan sonra fizyolojik modülatörler olarak hareket edene kadar gizlidir. Bir peptidin kimyasal yapısı ve aktivitesi arasındaki ilişki tahmin edilememekle birlikte aktivite amino asit sekansı, N

ve C-terminal amino asidin türü, peptit zincirinin uzunluğu, peptiti oluşturan amino asitlerin yük ve polaritesi gibi özelliklerle ilişkilendirilir (Li ve Yu, 2015).

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

1.3.1. Antihipertansif peptitler

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

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

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

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

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

BIOPEP gibi bazı veri tabanları peptitlerin potansiyelini tanımlamaya çalışmaktadır. BIOPEP uygulaması, biyolojik olarak aktif peptit dizilimlerinin bir veri tabanını,

protein parçalarında potansiyel biyolojik aktivite profillerinin oluşturulmasını, proteinlerin değeri ölçüsünde kantitatif tanımlayıcıların hesaplanması ve bir protein zincirinde endopeptidazlar ile hidrolize duyarlı bağların tahmin edilmesini sağlayan bir program içerir. Ayrıca alerjik ve toksik özelliklerin öngörülmesi için programlar da geliştirilmiştir (Minkiewicz vd.,2008).

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

1.3.2. Antidiyabetik peptitler

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

Dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV; EC.3.4.14.5), farklı biyolojik işlemlerde yer alan çok işlevli bir transmembran glikoproteindir. Prolin veya alanin kalıntılarından sonra dipeptitleri seçici bir şekilde kesen bir serin proteazdır. DPP-IV bağırsağın sindirim ve absorpsiyon mekanizmalarında anahtar enzimdir. Bu enzimin aktivitesi, GIP gibi

inkretinlerin yıkımına neden olmaktadır. Tip-2 diyabetlilerde GLP-1'in bozulmuş salınımının ve GIP'in hatalı etkisinin bir kombinasyonu nedeniyle inkretin etkisi azalır. Bu durum kan şekerinin artmasına neden olur ve kan damarları ve sinirler başta olmak üzere vücut dokusuna zarar verir. DPP-IV inhibisyonu, glukagon benzeri peptit 1'in (GLP-1) inaktivasyonunu önler ve aktif GLP-1 oranını artırır. Protein hidrolizatlarında DPP-IV'ü *in vitro* inhibe edebilen ve *in vivo* kan glikoz seviyesini düşürebilen biyoaktif peptitler üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Ahren, 2007; Barnett, 2006; Mazorra-Manzano vd., 2018).

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

1.3.3. Antioksidatif peptitler

Süperoksit radikal, hidroksil radikal, hidrojen peroksit ve peroksit radikali gibi reaktif oksijen molekülleri gıdalarda ve canlılar üzerinde de olumsuz etkilere neden olurlar. Oksidatif stres, bu serbest radikal gruplardaki artış ve antioksidatif savunma sistemleri arasındaki dengesizlik sonucu ortaya çıkar. Yapılan araştırmalarda oksidatif stresle

kalp rahatsızlığı, diyabet, kanser, Alzheimer gibi birçok rahatsızlığın arasında bir bağlantı olduğu öne sürülmüştür. Örneğin diyabette artmış bir oksidatif stres durumu gözlenmektedir ve oksidatif stresin diyabette mikro ve makrovasküler komplikasyonlara neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından vurgulanmaktadır. Antioksidanlar, oksidatif stres durumunu kontrol altına alabilir, oksitlenebilir bir substratın oksidasyonunu geciktirebilir veya önleyebilirler (Chakrabarti vd., 2014; Li ve Yu, 2015; Ünal vd., 2018; Pisoschi ve Pop, 2015).

Bütillenmiş hidroksitolüen (BHT) ve bütillenmiş hidroksianisol (BHA) gibi sentetik antioksidanlar, doğal antioksidanlara kıyasla etkili ve düşük maliyetli oldukları için gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ancak bu sentetik antioksidanların laboratuvar hayvanlarında karaciğer hasarına ve karsinogeneze neden olduğuna dair şüphelenilmekte ve bu nedenle gıda katkı maddesi olarak kullanımları kısıtlanmıştır. Birçok antioksidan, gıdalar da dahil olmak üzere doğal ham maddelerden izole edilmektedir. Peptitler ve amino asitlerin, pro-oksidatif metal iyonlarının bağlayıcı etkileri nedeniyle antioksidan özellikleri bulunmaktadır. (Chen vd., 2007).

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

1.4. Protein ve peptitlerin saflaştırılmasında kullanılan kromatografik yöntemler

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

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

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

Jel filtrasyon kromatografisi haricindeki tüm kromatografilerde proteinlerin kolon dolgu maddesine adsorbsiyonu sağlanarak ayırıştırma yapılır. Uygun bir sıvıda çözündürülmüş olan protein kolona enjekte edilir. Protein dolgu maddesi tarafından adsorplanarak kolona tutunur. İdeal koşullarda hedeflenen proteinin tutulması, diğerlerinin ise elüsyon tamponuyla kolondan uzaklaştırılması istenir. Daha sonra koşullar (pH, iyonik kuvvet, polarite gibi), tampon çözeltiler aracılığıyla kademeli olarak veya sürekli değiştirilir ve kolona bağlanan hedef proteinler bir fraksiyon toplayıcı aracılığıyla deney tüplerine toplanır (Akev, 2019).

1.4.1. Afinite kromatografisi

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

olmayan bir şekilde (örneğin, pH, iyonik kuvvet veya polariteyi değiştirerek) gerçekleştirilir. (Akev, 2019; GE Healthcare, 2010).

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

1.4.2. Jel filtrasyon kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi uygun koşullar altında moleküler boyutta farklılık gösteren maddelerin ayrılmasını sağlar. Jel filtrasyon kromatografisi ayrıca ayırma mekanizmasını daha yakından tanımlayan boyut dışlama kromatografisi (“size exclusion chromatography”, SEC) olarak da adlandırılır. Jel filtrasyon kromatografisi, protein saflaştırma veya numunenin iki ana gruba (büyük ve küçük molekül) ayrıldığı grup ayrımı için kullanılabilir. Grup ayırma genel olarak numunelerin tuzdan arındırılması ve tampon değişimi için kullanılır. Jel filtrasyon kromatografisi moleküllerin kolona bağlanmadığı bir yöntemdir. Jel filtrasyon kromatografisinin matrisinde doğal veya sentetik polimerlerden faydalanılır. Polimerlerin çapraz bağlanarak üç boyutlu ağlar kurmasıyla jeller oluşturulur. Jellerde boncuk şeklinde gözenekler bulunur ve bu gözeneklerin boyutları çapraz bağlanma oranlarına bağlı olarak değişmektedir. Bu yöntemde büyük moleküller jellerdeki gözeneklerin içine giremeden boncuklar arasındaki boşluklardan geçerek ilerlerken, küçük moleküller gözeneklere girerek zaman kaybeder ve bir süre sonra çözücü tarafından sürüklenerek kolondan çıkarlar. Dolayısıyla önce büyük moleküller daha sonra küçük moleküller kolondan ayrılır. Jel filtrasyon kromatografisinde kolona enjekte edilen numunenin hacminin küçük olması ve saflaştırılan proteinin seyreltik ve çok hacimli bir hale

gelmesi sebebiyle saflaştırma işleminin ardından örnek genellikle ultrafiltrasyon yöntemi ile konsantre edilir. Jel filtrasyon kromatografisi yönteminde genellikle birkaç kolon seri bağlanarak kullanılır ve elüsyon işleminin düşük basınçlar altında yapılması sebebiyle numuneyi saflaştırmak çok zaman alır. Bu yöntem, ultrafiltrasyon gibi ek işlemler gerektirebilmesi, saflaştırmanın uzun zaman alması ve bunlara bağlı olarak oluşan ek maliyetler sebebiyle endüstride pek tercih edilmez. Jel filtrasyon kromatografisi analiz amaçlı protein saflaştırılmasının ilk aşamalarında veya son aşamada protein konsantre ve küçük bir hacimdeyken bu yöntemden yararlanır (Akev, 2019; Konak vd., 2014).

1.4.3. İyon değişim kromatografisi

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

İyon değiştiricilerin matrisinde genellikle modifiye edilmiş polisakkarit ve türevleri kullanılmaktadır. Örneğin iyon değiştirici kolonlarda en çok tercih edilen Sephadex matrisi modifiye bir deksrandır. Çapraz bağlı bir agaroz olan Sepharose ve çapraz bağlı bir sellüloz olan Sephacel matrisleri de sıkça kullanılmaktadır. Ancak bir iyon değiştirici kolonda en önemli kısım ligand olarak da bilinen fonksiyonel gruplardır. Bu grupların özellikleri iyon değiştiricinin sınıfını ve gücünü belirler (bkz. Tablo 1.2).

Güçlü iyon değişim ligandları geniş pH aralıklarında yük özelliklerini ve bağlama kapasitelerini koruyabilirler. Zayıf iyon değişim ligandları ise değişen pH değerine bağlı olarak kapasitelerinde belirgin bir değişim gösterirler (Akev, 2019; Konak vd., 2014).

Tablo 1.2: İyon değişim ligandları ve fonksiyonel grupları (Konak vd., 2014)

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

1.4.4. Hidrofobik etkileşim kromatografisi

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

Hidrofobik etkileşim kromatografisi, proteinleri hidrofobisite farklılıklarına göre ayırır. Ayırma, bir protein ve bir kromatografik ortamın hidrofobik yüzeyi arasındaki geri dönüşümlü etkileşime dayanır. Genellikle amonyum sülfat ile çökeltilmiş veya iyon değişim kromatografisi sonrasında yüksek tuz içeren proteinlerin sonraki saflaştırma adımı olarak kullanılır. Proteinin hidrofobisitesini artırmak için çözeltiye tuz ilavesi yapılır. Tuz, proteinin etrafındaki su moleküllerini çekerek hidrofobik

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

1.4.5. Ters faz kromatografisi

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

1.5. Fındık

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

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

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

Türkiye'de bazı özellikleri birbirinden farklı olan birçok fındık çeşidi yetiştirilmektedir. Bunlar; Tombul, Palaz, Çakıldak, Kara, Fosa, Mincane, Uzunmusa, Kan, Kargalak, Cavcava, Sivri, Acı, Kuş, Yuvarlak Badem ve Yassı Badem olarak sıralanmaktadır (Özdemir ve Akıncı, 2004). Türk Fındıkları kalitelerine göre ise Giresun ve Levant kalite olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Giresun ilinin tamamında yetiştirilen "Tombul Fındık" dünyanın en üstün özelliklere sahip fındığı olarak bildirilmiştir. Dünyadaki fındık çeşitleri içinde en yüksek oranda zar atan fındıktır (Köksal vd., 2006).

Dünya fındık üretiminin yaklaşık olarak %70'lik payını elinde tutan Türkiye en önemli fındık üreticisi ülkedir. Son on yıllık ortalamaya göre 550.000 tonluk fındık üretimi gerçekleştirmektedir. Türkiye, 38 tanesi Avrupa kıtasına ait olmak üzere toplamda 112 farklı ülkeye 2017 yılında fındık ihraç etmiştir. Fındık ihracatımızda en önemli ticari ortaklarımız Avrupa Birliği ülkeleri olmaktadır. Almanya başta olmak üzere İtalya, Fransa ve Kanada, Türkiye'nin en fazla ihracat yaptığı ülkelerdir (Tablo1.3) (TİM, 2018).

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

Tablo 1.3: Türkiye'nin 2017 fındık ihracatı rakamları (TİM, 2018).

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

Fındık, istenilen tatları oluşturmanın yanı sıra insan beslenmesinde ve sağlığında besin öğelerinin çeşitliliği ve zenginliği bakımından önemli bir meyvedir. Ana bileşeni yağ olmasına rağmen protein miktarı da oldukça yüksektir. Fındığın 100 gramında % 50-73 yağ, % 10-12 karbonhidrat, % 10-24 protein, % 2-4 rutubet, % 1-3 selülozik bileşikler ve pektin, % 2-3 kül içermektedir. Aynı zamanda 1 kg fındığın 6000-6500

kilokalorilik bir enerji değerine sahip olduğu bilinmektedir (Köksal vd., 2006; Garcia vd., 1994).

Köksal vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada Türk fındık çeşitlerinin bileşimleri kapsamlı olarak araştırılmıştır (Tablo 1.4).

Tablo 1.4: Türkiye’de yetiştirilen farklı fındık çeşitlerine ait nem, yağ, kül, protein miktarları (Köksal vd., 2016).

eşit	Nem (%)	Kül (%)	Yağ (%)	Protein (%)
Acı	4.09	2.22	63.41	16.63
Cavcava	5.25	2.72	56.07	20.83
akıldak	4.86	2.60	60.67	19.44
Foşa	4.46	2.25	59.50	15.75
İncekara	4.27	2.41	60.75	16.28
Kalınkara	4.14	1.87	68.52	11.73
Kan	3.41	2.13	63.05	16.98
Karafındık	3.49	1.90	67.75	15.58
Kargalak	4.39	2.37	59.57	15.23
Kuş	4.41	2.30	61.25	16.80
Mincane	4.71	2.43	57.95	19.96
Palaz	4.76	2.61	57.65	18.03
Sivri	4.78	2.30	63.89	18.73
Tombul	4.63	2.43	64.60	17.51
Uzunmusa	4.17	2.34	61.75	16.98
Yassı Badem	3.56	2.42	63.48	17.86
Yuvarlak Badem	4.61	2.46	58.35	20.84

1.5.1. Fındık proteinleri

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

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

Liu vd. (2018a) tarafından Asya yabani fındık (*Corylus heterophylla* Fisch.) proteinlerinde ACE inhibe edici peptitler araştırılmıştır. Sırasıyla iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanarak saflaştırılan peptitler, sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyonu-tandem kütle spektrometresi (LC-ESI-MS/MS) ile tanımlanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre Ala-Val-Lys-Val-Leu, Tyr-Leu-Val-Arg ve Thr-Leu-Val-Gly-Arg dizilimine sahip yeni ACE inhibe edici peptitler belirlenmiştir. Bu peptitlerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 73.06, 15.42 ve 249.3 µM olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Liu vd. (2018b) önceki çalışmasında elde ettiği, C2 şeklinde isimlendirilmiş fraksiyondan antioksidan aktivite gösteren altı yeni peptit tanımlanmış ve bu peptitler sentetik olarak elde edilerek antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Bu peptitlerin amino asit dizileri Ala-Asp-Gly-Phe (408.16 Da), Ala-Gly-Ggly-Phe (350.16 Da),

Ala-Trp-Asp-Pro-Glu (616.25 Da), Asp-Trp-Asp-Pro-lys (659.29 Da), Glu-Thr-Thr-Leu (462.23 Da) ve Ser-Gly-Ala-Phe (380.17 Da) olarak bildirilmiştir. Bu 6 sentetik peptidin tümü antioksidan aktivite göstermiş ve bunlar arasında Ala-Asp-Gly-Phe peptiti en yüksek ABTS radikal süpürme aktivitesi ve DPPH radikal süpürme yeteneğini sergilemiştir. Bu nedenle, yabancı fındık proteini hidrolizatlarından izole edilen peptitlerin, gıda ve ilaç endüstrisinde potansiyel antioksidanlar olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür.

1.5.2. Çalışmada fındık proteinlerinin hidrolizi amacıyla kullanılan enzimler

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

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

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

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

Literatürde fındık proteinlerinin ve peptitlerinin biyoaktif özellikleri üzerine çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Buna ek olarak, literatürde düzenli olarak fındık ve bileşenlerinin alerjik özelliklerine vurgu yapıldığı bilinmektedir. Bu iddiaların bilimsel temeli olmakla birlikte doğru teknolojik uygulamalarla hem insan sağlığına olumlu etkileri bulunan hem de alerjik özellikleri baskılanmış fındık bileşenleri üretilebileceği düşüncesini taşımaktayız. Aynı zamanda enzimatik parçalanmanın alerji giderici potansiyeli de bulunabilmektedir (Yu vd., 2011). Bu çalışmada ülkemiz ekonomisinde oldukça önemli bir yeri olan Giresun tombul fındığına ait soğuk pres posalarında farklı enzim ve modern fraksiyonlama teknikleri kullanılarak antihipertansif, antidiyabetik ve antioksidatif etkileri bulunan biyoaktif peptitlerin üretilmesi hedeflenmiştir.



İKİNCİ BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

2.1. Materyaller

Antihipertansif, antidiyabetik ve antioksidatif peptitler elde etme amacıyla yapılan bu çalışmada endüstriyel yağlı fındıkların soğuk pres posaları hammadde olarak kullanılmıştır. Giresun tombul fındığı (*Corylus avellana* L.) posası Oneva (Neva Gıda Ltd., İstanbul, Türkiye) tarafından temin edilmiştir.

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

2.2. Metot

2.2.1. Bitkisel posalardan protein konsantrelerinin üretilmesi

Protein konsantrelerinin üretimi için Boye vd. (2010) tarafından bildirilen alkali ekstraksiyonu-izoelektrik çöktürme (AE-İÇ) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde yağ alınmış fındık küspeleri su ile karıştırılarak (1:15, ağırlık/hacim) dispers hale getirilmiştir. Ortamın pH değeri 1 N NaOH çözeltisi kullanılarak pH 9,5'a sabitlenmiş ve dispersiyon, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile 500 rpm'de 1 saat karıştırılmıştır. Ardından dispersiyonlar, yüksek hızlı santrifüj CR22 N (Hitachi Koki Co., Ltd., Tokyo, Japonya) kullanılarak 10000xg'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir (20°C). Çözünmüş proteinleri içeren sıvı faz toplanarak ortamın pH değeri 1 N HCl ile pH 4,5 değerine indirilmiştir. Böylelikle proteinlerin izoelektrik çökmesi teşvik edilmiştir. Çökelen proteinleri ayırmak için aynı koşullarda tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Çökelen protein konsantreleri toplanarak liyofilizasyon işlemine kadar -20°C'de saklanmıştır.

2.2.2. Protein konsantrelerinin proteolitik hidrolizi

Fındık proteini hidrolizatlarının üretimi için tripsin, kimotripsin ve termolisin proteazları kullanılmıştır. Dispersiyon %1 fındık protein konsantreleri kullanılarak

100 mM Tris-HCl pH:8 tamponunda hazırlanmıştır. Protein dispersiyonlarına, tripsin ve kimotripsin için 1:100, termolisin için 1:50 (enzim: substrat) oranda proteazlar eklenmiştir. Enzimatik proses uygun bir karıştırıcı termomikser kullanılarak 37°C 1000 rpm'de üzerinden 1 gece geçecek biçimde (18 saat) sürdürülmüştür. Bu süreci takiben enzim inhibisyonu için çözeltiler 95°C'ye ısıtılıp bu sıcaklıkta 5 dakika tutulmuştur. Sonrasında numuneler buz banyosuna alınarak hızlıca soğutulmuştur. Termolisin enziminin inhibisyonu için ayrıca final konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde formik asit çözeltisi (%10) eklenmiştir. Çözünmeyen parçacıklar santrifüj yoluyla (30 dakika, 5000xg) ayrılmıştır. Son olarak, numuneler 0.45 µm PVDF şırınga filtreden geçirilmiştir (Gülseren & Corredig, 2013).

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

2.2.3. TNBS yöntemi ile hidroliz derecesinin belirlenmesi

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

TNBS yöntemi Adler-Nissen (1979) tarafından tarif edilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bir gece geçecek biçimde (18 saat) inkübe edilen %1 oranında protein içeren hidrolizat örnekleri, enzim inaktive edildikten ve santrifüjlendikten sonra, %1'lik SDS ile seyreltilmiştir. Daha sonra 0.25 mL'lik örnekler aliminyum folyo ile sarılmış deney tüplerine alınarak üzerlerine 2 mL 0.2125 M sodyum fosfat tampon (pH 8.2) ve 2 mL %0,1'lik TNBS ilave edilerek su banyosunda 50°C sıcaklıkta 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için deney tüplerine 4 mL 0.1 N HCl ilave edilmiştir. Örneklerin absorbans değerleri Shimadzu UV-1280 model UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu, Milton Keynes, İngiltere) cihazı kullanılarak 340 nm'de kontrol çözeltilisine karşı okunmuştur. Kontrol çözeltisi için 0.25 mL %1'lik SDS ve standart çözeltisi için 1.5 mM L-lösin kullanılmıştır.

Ayrıca referans örnek olarak sodyum kazeinat (C8654, Sigma-Aldrich Corp.) kullanılmıştır. Sodyum kazeinat, protein numuneleri ile benzer koşullarda triptik hidrolize tabi tutulmuştur. Örneklerin lösün amino eşdeğeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{lösün NH}_2(\text{meqv/g}) = \frac{\text{Abs}_{\text{örnek}} - \text{Abs}_{\text{kontrol}}}{\text{Abs}_{\text{standart}} - \text{Abs}_{\text{kontrol}}} \times S \times C_{\text{standart}} \quad (2.1)$$

Abs: Absorbans değerleri (340 nm)

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

S: Seyreltme faktörü

X: Örnek miktarı (g)

P: Örnekteki % protein miktarı

Örneklerin hidroliz derecelerinin hesaplanmasında aşağıdaki eşitlikler kullanılmıştır.

$$\%DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 \quad (2.2)$$

$$h = (\text{lösün NH}_2 - b) / a \text{ meqv/g protein} \quad (2.3)$$

DH: Hidroliz derecesi

h: Parçalanmış peptit bağları (meqv/g protein)

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

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

2.2.4. Peptitlerin fraksiyonlara ayrılması

Hidroliz edilen fındık proteinleri AKTA- Pure 25-L1 FPLC kromatografi sistemi (GE Healthcare, Buckinghamshire, İngiltere) kullanılarak fraksiyonlanmıştır. Fraksiyonlama işlemi için HiTrap Capto Q (GE Healthcare, Buckinghamshire, İngiltere) anyon değişimi kolonu ile yürütülmüştür. Bu hazır kolonda boyut farklılığının fraksiyonlamaya etkisinin olup olmadığını incelemek amacıyla 1 ml ve 5 ml yatak hacimli iki farklı boyut denenmiştir. Kolon hacminde akış hızı (1 CV/dk)

verilerek yine kolon hacmi kadar hidrolizat örnekleri kolona enjekte edilmiştir. Kolona bağlanmayan bileşiklerin uzaklaştırılması için 5 kolon hacminde (CV) tuz içermeyen 20 mM Tris-HCl (pH:8.3) tamponu ile kolon yıkanmıştır. Yıkama sırasında kolondan uzaklaştırılan bileşikler aktivite testlerinde kullanılmak üzere toplanmıştır. Kolona bağlı bileşiklerin elüsyon işlemi için ise tuzlu 20 mM Tris-HCl (0,6 M NaCl, pH 8.3) tamponu kullanılmıştır. Elüsyon işlemi 32 CV boyunca 0,6 M NaCl konsantrasyonuna kadar tuz konsantrasyonu lineer bir şekilde artırılarak gerçekleştirilmiştir. Elüsyon işlemi boyunca 2 CV aralıklarla fraksiyonlama yapılarak kolondan koparılan bileşikler deney tüplerine toplanmıştır. Tüm aşamalarda 280 nm dalga boyunda UV dedektör ve iletkenlik değerleri takip edilmiştir. Toplanan tüm fraksiyonlar aktivite testlerinde kullanılmak üzere -20°C de kısa süreli depolanmıştır. DPP-IV önleyici aktivite testi için ayrı olarak 100 mM Tris-HCl pH:8 tamponunda aynı şekilde fraksiyonlama işlemi yapılmıştır.

2.2.5. ACE-önleyici aktivite testleri

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

Bu çalışmada, ODS-3 C18 kolonu kullanılarak Sheih vd. (2009) tarafından tarif edilen yöntem uygun değişikliklerle kullanılmıştır. ACE aktivitesi testi HPLC sistemi (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japonya) kullanılarak gerçekleştirildi. HPLC sistemi; sıvı kromatografi LC-20AD solvent dağıtıcı modülü, SIL-20A HT oto örnekleyici, DGU-20A5R degazer, SPD-20A UV-VİS dedektör ve CTO-10AS VP kolon fırından oluşturulmuştur. ACE aktivite gösterebilmesi için final konsantrasyonunda yaklaşık 300 mM NaCl içermesi gerekli görülmüştür. Bu nedenle önceden 20 mM Tris-HCl tamponunda saflaştırılan peptit fraksiyonlarının tuz konsantrasyonları yaklaşık olarak 0.6 M NaCl içerecek şekilde ayarlanmıştır. Sodyum borat (0.1 M pH:8.3) tamponunda hazırlanan 1.68 mU 250 µl ACE ile 250 µl peptit fraksiyonu karıştırılarak 5 dakika 37°C 500 rpm'de termomikser içerisinde ön inkübasyon yapılmıştır. Bu işlemi takiben 3.94 mM HHL (15 µl) karışıma eklenerek tepkime 1 saat sürdürülmüştür. Süre bitiminde, 1 M HCl (500 µl) karışıma eklenerek tepkime durdurulmuştur. Bu karışımdan 10 µl doğrudan kolona enjekte edilerek ACE inhibisyonu 228 nm'de takip edilmiştir. Mobil faz olarak % 50 metanolde hazırlanmış

% 0,1 TFA kullanılmıştır. İsokratik akış hızı, 0.6 ml/dakika olarak kullanılmıştır. Kontrol olarak 20 mM Tris-HCl + 0,6M NaCl tamponu kullanılmıştır. Referans inhibitör olarak kaptopril inhibitöründen yararlanılmıştır. Kaptopril, Tris-HCl+0,6M NaCl tamponunda çözdürülerek final konsantrasyonunda 0,05 µM içerecek şekilde hazırlanmıştır. Kontrol değerinde HHL'nin ACE varlığında %100 HA'ya dönüştüğü varsayılmıştır ve hesaplamalar bu varsayıma göre yapılmıştır. HA'daki azalmanın araştırıldığı fraksiyon örnekleri, kontrol örneği ile kıyaslanarak % inhibisyon değerleri belirlenmiştir.

2.2.6. DPP-IV önleyici aktivite testleri

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

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

2.2.7. Demir şelasyon aktivitesi testi

Fe²⁺ (demir-II) iyonlarını bağlamak için, demir iyonlarının indikatörü olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışması beklenir. Metal bağlayıcı bileşiklerin şelatlama aktivitesine bağlı olarak magenta renkli Fe²⁺-ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir. Bu yöntem bileşiklerin demir iyonlarını bağlayarak engellemesi ve 562 nm'de maksimum absorbans veren magenta rengin ve absorbans

değerinin giderek azalması esasına dayanmaktadır. Düşük absorbands değeri, ilgili bileşiğin yüksek demir iyonu bağlama aktivitesine işaret etmektedir (Acay, 2018).

Bu çalışmada protein hidrolizatlarının Fe²⁺ iyonlarını şelatlama kapasitesi Dinis vd. (1994) yöntemine uygun olarak belirlenmiştir. Tampon çözeltilerin analiz sonuçlarını engellemesi sebebiyle bu test için tampon çözelti kullanılmadan proteinler hidroliz edilmiş ve fraksiyonlama işlemi yapılmadan doğrudan hidrolizat örnekleri kullanılmıştır.

Tripsin, kimotripsin ve termolisin enzimleri ile önceki bölümlerde hazırlanışı tarif edilen (bkz. Bölüm 2.2.2) 0,5 ml hidrolizat örneği, 1,6 ml deiyonize su ve 0,05 ml 2 mM FeCl₂ ile karıştırılmıştır. 30 saniye sonra bu karışıma 0,1 ml 5 mM ferrozin eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyonun ardından numunelerin absorbandsları 563 nm’de UV- 1280 UV- Vis spektrofotometresi (Shimadzu, Japonya) ile ölçülmüştür. Kontrol örneği için 2,1 ml deiyonize su kullanılmıştır. Bu testte, EDTA pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Numunelerin % şelatlama kapasitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

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

2.2.8. Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi

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

Bu çalışma Halliwell vd. (1987) tarafından gerçekleştirilen yöntemine uygun olarak yapılmıştır. 0.1 ml 10 mM FeSO₄, 0.1 ml 10 mM EDTA, 0.5 ml 10 mM α-deoksiriboz, 0.9 ml sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4), 0,2 ml peptit çözeltisi karıştırılmıştır. Bu karışıma 0,2 ml 10 mM H₂O₂ eklenerek 37°C’de numuneler 1 saat boyunca inkübe

edilmiştir. Bu işlemin hemen ardından 1 ml %2,8 TCA ve 1 ml %1 TBA numune tüplerine katılarak tüpler 15 dakika boyunca kaynayan bir su banyosunda tutulmuştur. Numune sıcaklığı oda sıcaklığına inince absorbans değerleri 532 nm’de UV- 1280 UV- Vis spektrofotometresi (Shimadzu, Japonya) ile ölçülmüştür. Kontrol örneği olarak peptit çözeltisi yerine tampon çözelti kullanılmıştır. BHT (0,03 mg/ml), bu deneyde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Numunelerin % Hidroksil radikali tutma kapasitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

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

2.2.9. Superoksit anyon tutma aktivitesi testi

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

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

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

2.2.10. Peptitlerin tanımlanması

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

a) Örnek hazırlığı ve LC-MS/MS analizi

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

b) LC-MS/MS analizi

Analiz öncesi, analizlerin gerçekleştirildiği Xevo G2-XS QToF (Waters) cihazına özgü olan MassLynx programı aracılığı ile dedektör ve kalibrasyon ayarları yapılmıştır. Metot SONAR ve sensitivite moduna getirilerek, oluşturulan triptik peptitler hidrofobikliklerine göre HSS T3 kolonunda asetonitril gradienti ile fraksiyonlanmıştır. Asetonitril %5-35 aralığında arttırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlandı ve elektrospray iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edilmiştir. Analiz esnasında, m/z 50-1950 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplanmıştır. 0,7sn kadar MS analizi gerçekleştirildi ve peptidin bütünü hakkında bilgi toplanmıştır. Ardından 0,7sn kadar MS/MS analizi yapıp peptidin parçalanması ve sekans bilgisinin elde edilmesi sağlanmıştır. Protein tanımlamaları yapılırken her bir örnek için uygun protein databankları kullanılmıştır.

c) Veri analizi

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

Peptit toleransı fe fragment toleransı: Otomatik

Her peptit için minimum fragment iyon eşleşmesi: 2

Her protein için minimum iyon eşleşmesi: 5

Her protein için minimum peptit eşleşmesi: 1

Maksimum protein kütlesi: 250000

Primer enzim: Tripsin, kimotripsin, termolisin

Missed cleavages:1

Fixed modification: Carbamidomethyl C

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

Lock Mass for Charge 1: 785.8426 Da/e

Lock Mass Window: 0.25 Da

Low energy threshold: 60 counts

High energy threshold: 10 counts

2.2.11. ACE ve DPP-IV aktif fraksiyonların özelliklerinin değerlendirilmesi

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

- Uygun tekniklerle dizilimleri belirlenen peptitlerin fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesi literatürde bulunan *in silico* yöntemler kullanılarak yürütülmüştür.
- Öncelikle peptitlerin izoelektrik noktası ve toksisite parametreleri Gupta vd. (2013) çalışmasına uygun olarak belirlenmiştir.
- Peptit dizilimlerinin biyoaktif olma ihtimali, biyoaktivite çeşidinden bağımsız olarak Mooney vd. (2012) çalışmasına uygun olarak hesap edilmiştir.
- Aktif fraksiyonların ilgili aktiviteyi spesifik olarak ortaya çıkarma potansiyeli ve ilgili inhibisyon parametreleri Minkiewicz vd. (2008) çalışmasına uygun olarak belirlenmiştir.
- Son olarak, biyoaktivitenin gözlemlendiği ve *in silico* bulgularla bu gözlemlerin desteklendiği durumlarda, ilgili peptitlerin ve inhibe ettikleri enzimlerin arasındaki etkileşimler Trabuco vd. (2012) tarafından öngörüldüğü biçimde belirlenmiş ve ilgili çizimler hazırlanmıştır.

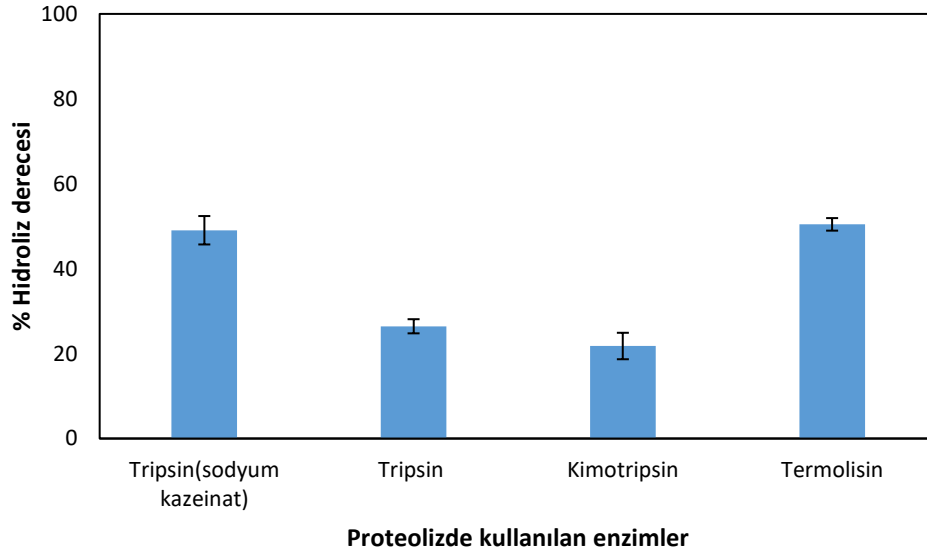
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

Fındık proteinlerinde antihipertansif, antidiyabetik ve antioksidatif peptitler belirlemek amacıyla Türkiye TÜBİTAK 1001 Programı 217O063 numaralı proje kapsamında yürütülen bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

3.1. Hidroliz derecesi

Farklı enzimlerle 18 saat muamele edilen fındık proteinlerinin hidroliz derecesi Adler-Nissen (1979) tarafından tarif edilen Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.1 de gösterilmiştir. Referans örnek olarak sodyum kazeinat kullanılmıştır.



Şekil 3.1: TNBS yöntemiyle belirlenen, çeşitli proteazlar tarafından hidrolize edilmiş fındık posası proteinlerinin hidroliz derecesi. Tripsinolizde referans örnek olarak sodyum kazeinat kullanılmıştır.

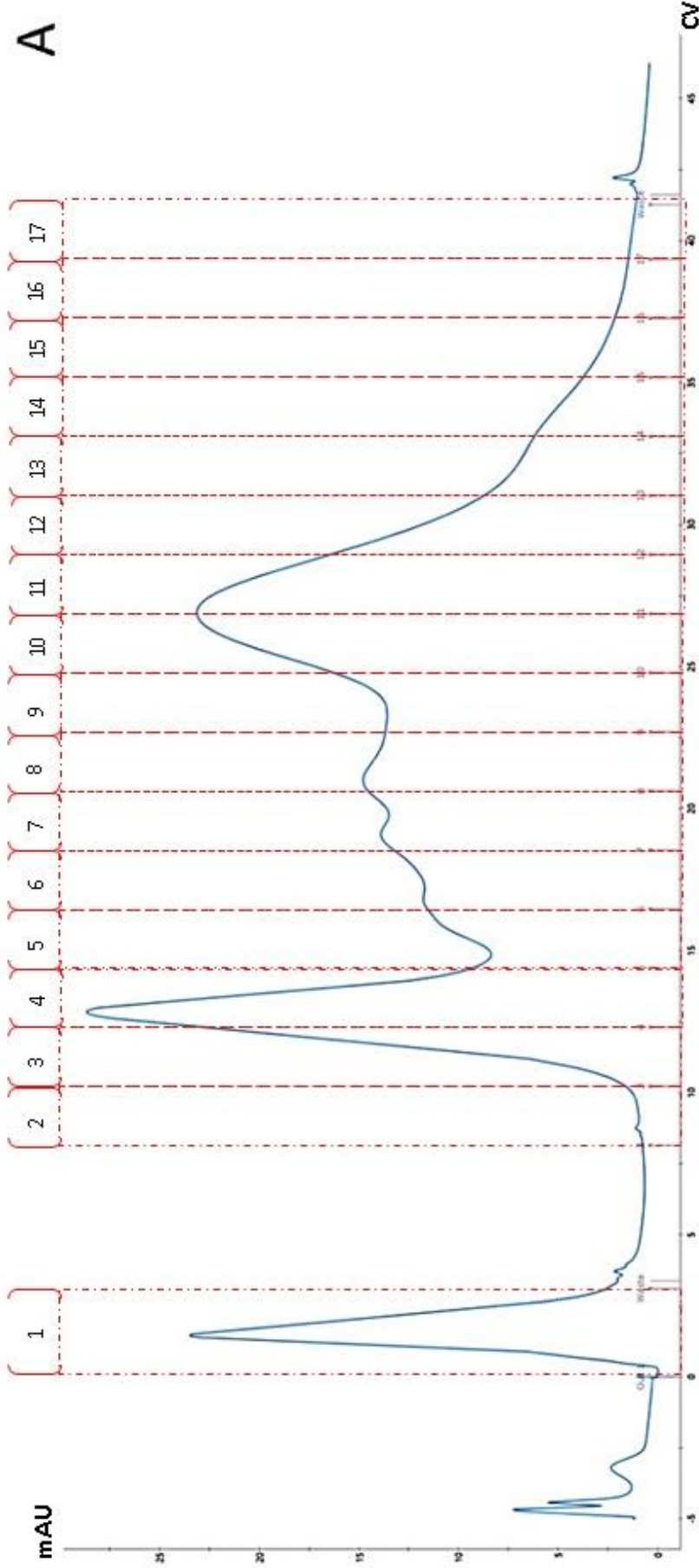
Bu araştırmada elde edilen %1 konsantrasyondaki tripsin, kimotripsin ve termolisin hidrolizatları sırasıyla %26,43±1.7, % 21,8±3.1, % 50,4±1.5 hidroliz derecesine sahiptir. Referans örnek sodyum kazeinatın hidroliz derecesi %49±3,3 bulunmuştur ve Nielsen vd. (2001) tarafından belirtilen %42-%62 değerler aralığındadır. Tripsin, kimotripsin ve termolisin hidrolizatlarının değerleri karşılaştırıldığında termolisin enziminin diğerlerine kıyasla fındık proteinlerini belirgin ölçüde daha fazla hidroliz ettiği görülmektedir. Bu durum termolisin enziminin yüksek bir aktiviteye sahip

olmasıyla da açıklanabilir (Gülseren, 2018). Mevcut değerlere göre tripsin enzimi fındık proteinini parçalamada sodyum kazeinata göre daha düşük aktivite göstermiştir. Ancak bu durum kısmen TNBS yönteminin sadece serbest amino gruplarının miktarını vermesinden kaynaklanabileceği de bildirilmiştir (Polychroniadou, 1988).

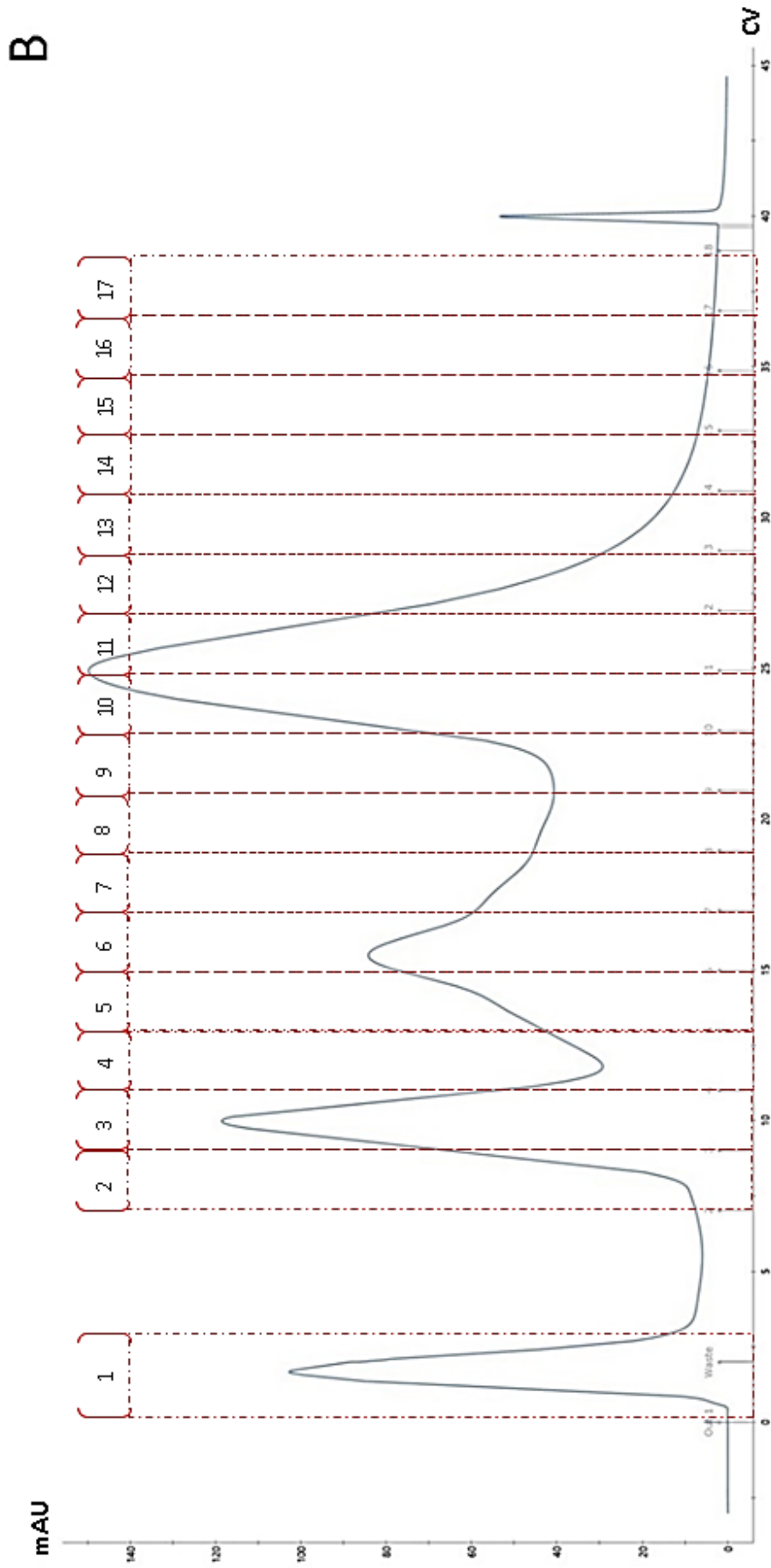
3.2. Peptit numunelerinin anyon değişimi yöntemi ile fraksiyonlanması

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

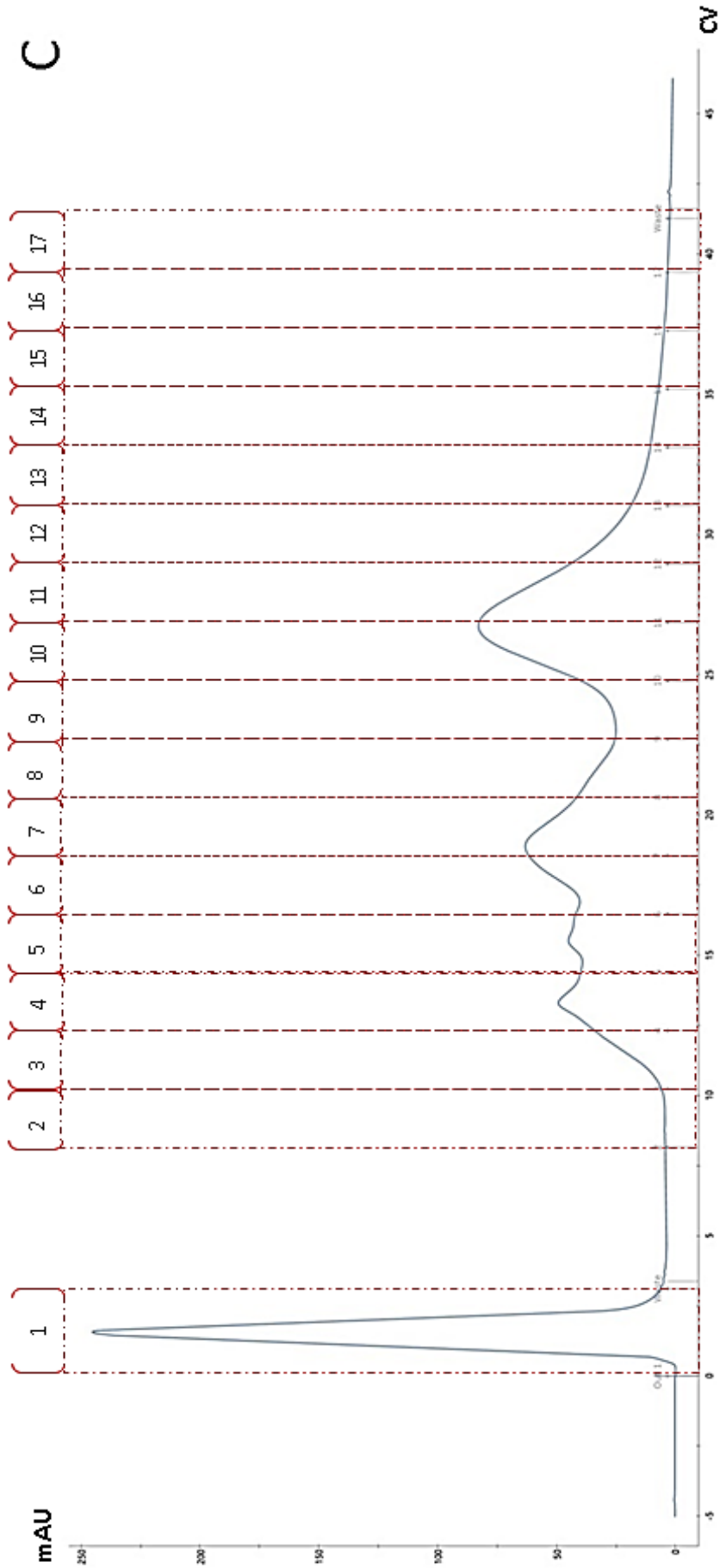
Tripsin, kimotripsin ve termolisin hidrolizatlarından peptitlerin fraksiyonlanması için elüsyon işlemi 20 mM Tris-HCl (pH 8.3) tamponu kullanılarak 32 CV boyunca 0,6 M NaCl konsantrasyonuna kadar tuz konsantrasyonu lineer bir şekilde artırılmış ve ayırım, 280 nm UV dalga boyunda takip edilmiştir (Şekil 3.2). DPP-IV önleyici aktivite testi için ayrı olarak 5 ml yatak hacimli kolonda 100 mM Tris-HCl pH:8 tamponu kullanılarak aynı şekilde fraksiyonlama işlemi yapılmıştır (Şekil 3.3). Enzimatik hidroliz süreçlerinde elde edilen numuneler, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3 de gösterildiği gibi ayırlara tabi tutularak 2 kolon hacminde (CV) fraksiyonlar deney tüplerine alınmıştır. Kolona bağlanmayan peptitler deneyin başında ayrı bir tüpe toplanmıştır ve bu tüpler “out” fraksiyonu olarak isimlendirilmiştir. Her bir hidrolizat örneğinden 17 fraksiyon alınmıştır. Fraksiyonlar alınma sıralarına göre numaralandırılmış ve kullanılan enzime göre harflendirilmiştir (tripsin:T, kimotripsin:C, termolisin:E). Örneğin kimotripsin hidrolizatının 3. fraksiyonu için C3 adı verilmiştir. Alınan peptit fraksiyonları aktivite testlerinde kullanılmak üzere -20°C de kısa süreli depolanmıştır.



Şekil 3.2: Hidrolizat örneklerinin 20 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak 1 ve 5 ml yatak hacimli Capto-Q anyon değişim kolonunda fraksiyonlanması (X: kolon hacmi-CV, Y: Absorbans- 280 nm). (A, B) Kimotripsin hidrolizatlarının, (C, D) Termolisin hidrolizatlarının, (E, F) Tripsin hidrolizatlarının sırasıyla 1 ve 5 ml yatak hacimli kolonlarda 32 CV elüsyonu.

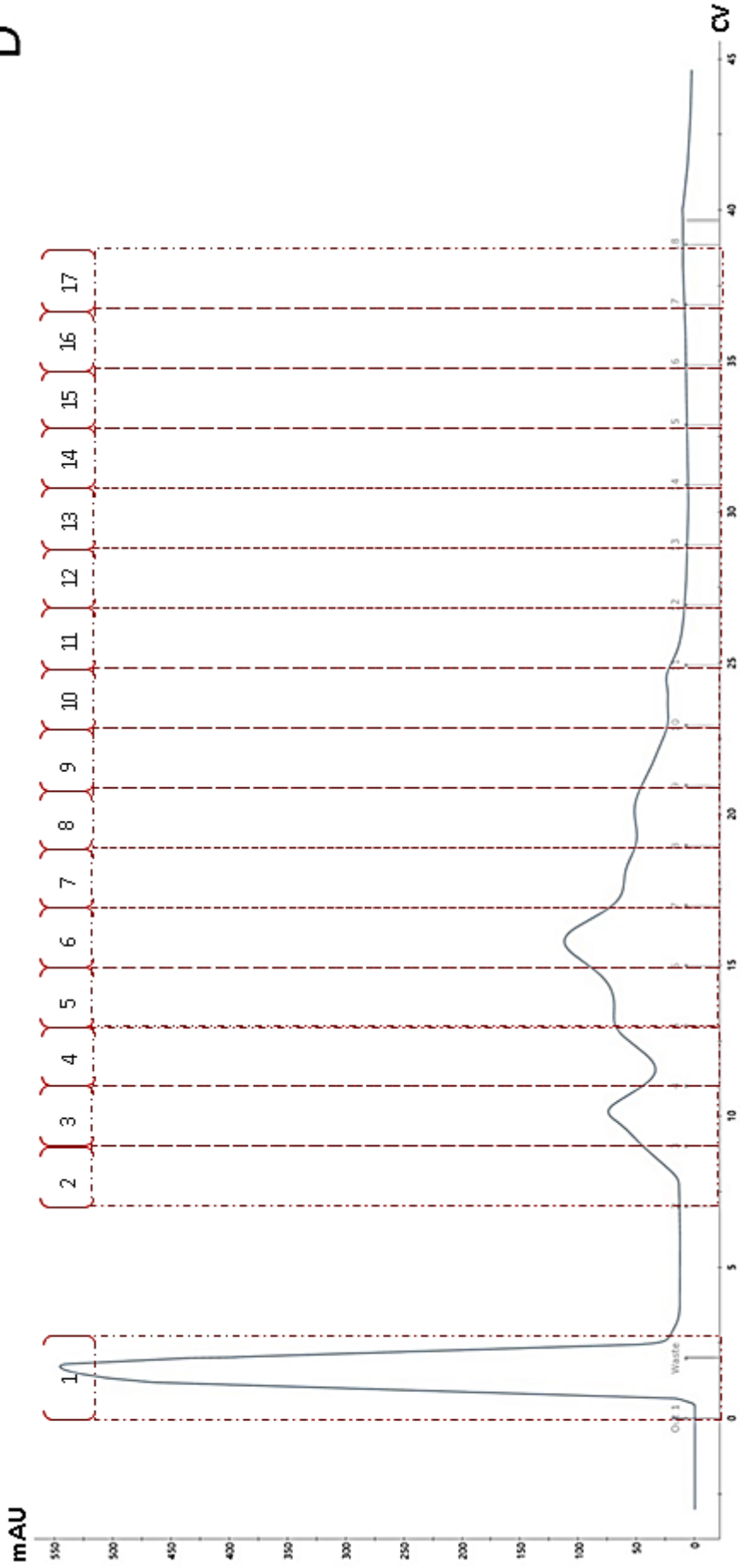


Şekil 3.2 devam ediyor

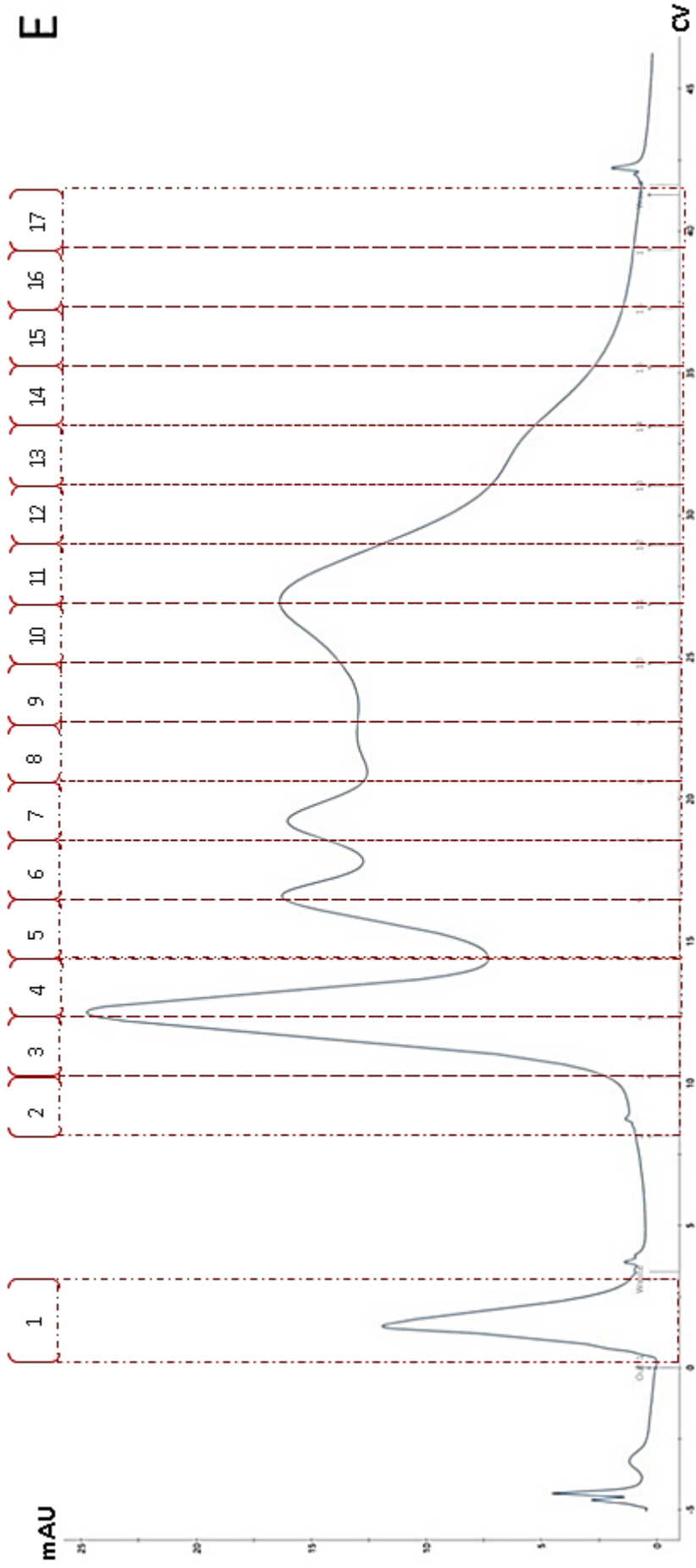


Şekil 3.2 devam ediyor

D

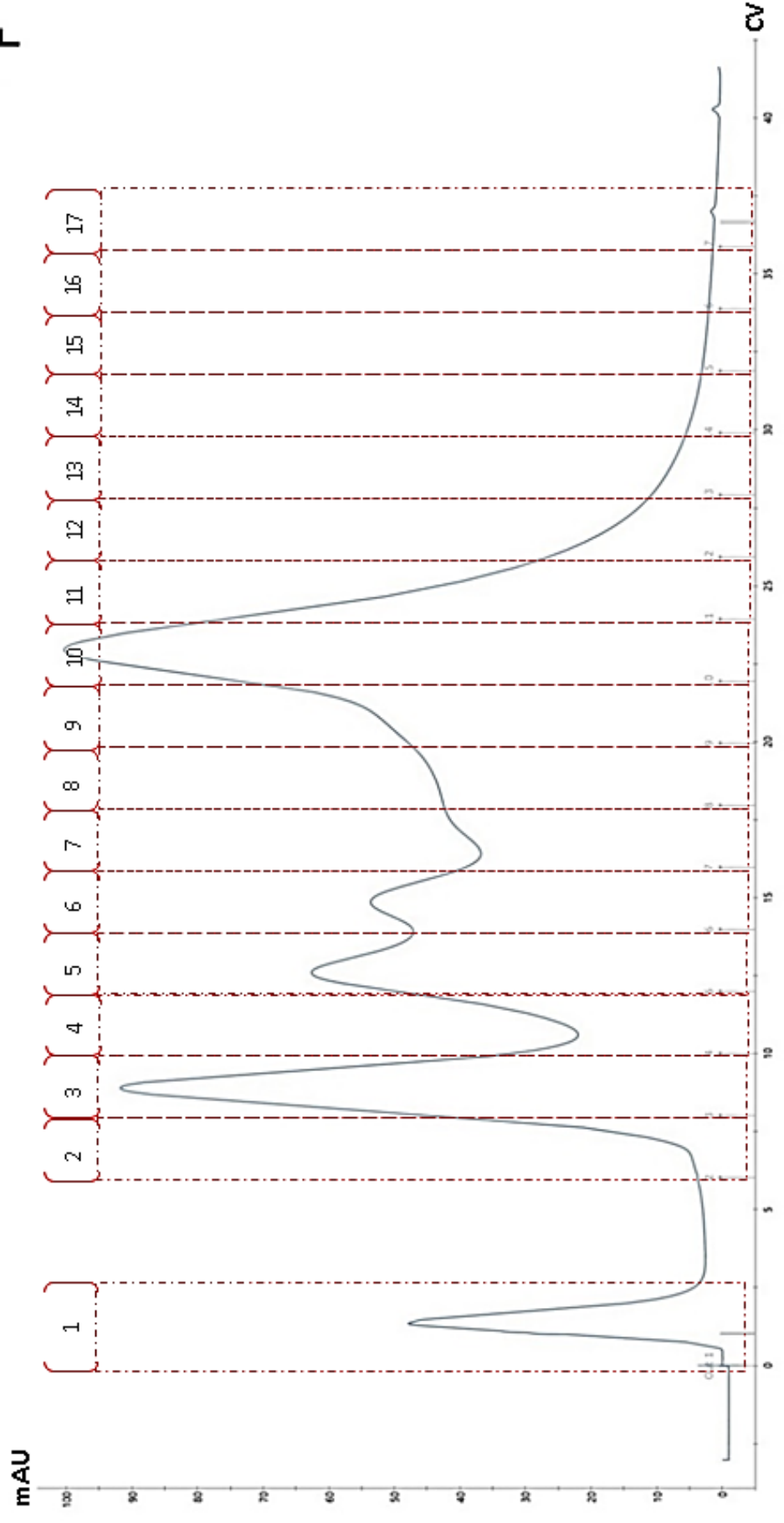


Şekil 3.2 devam ediyor



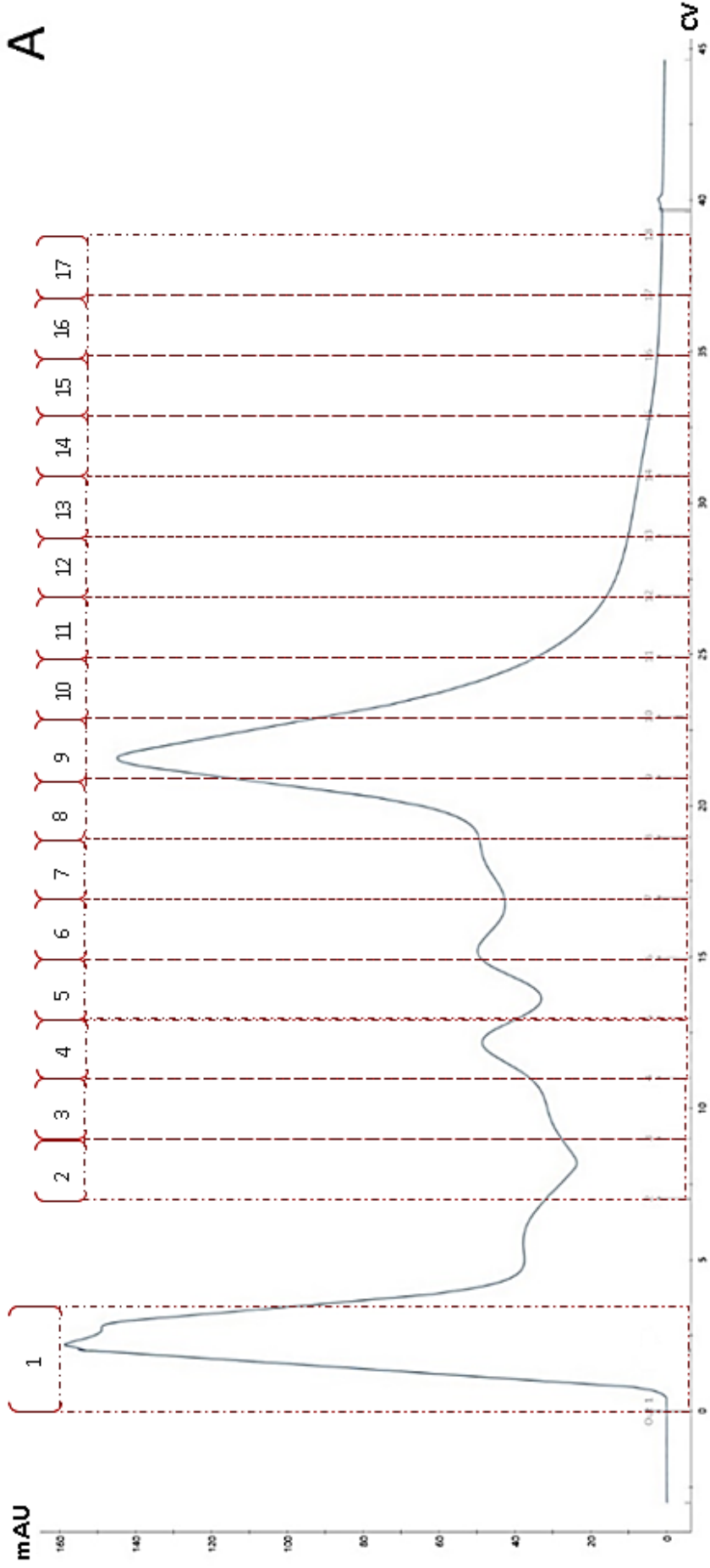
Şekil 3.2 devam ediyor

F

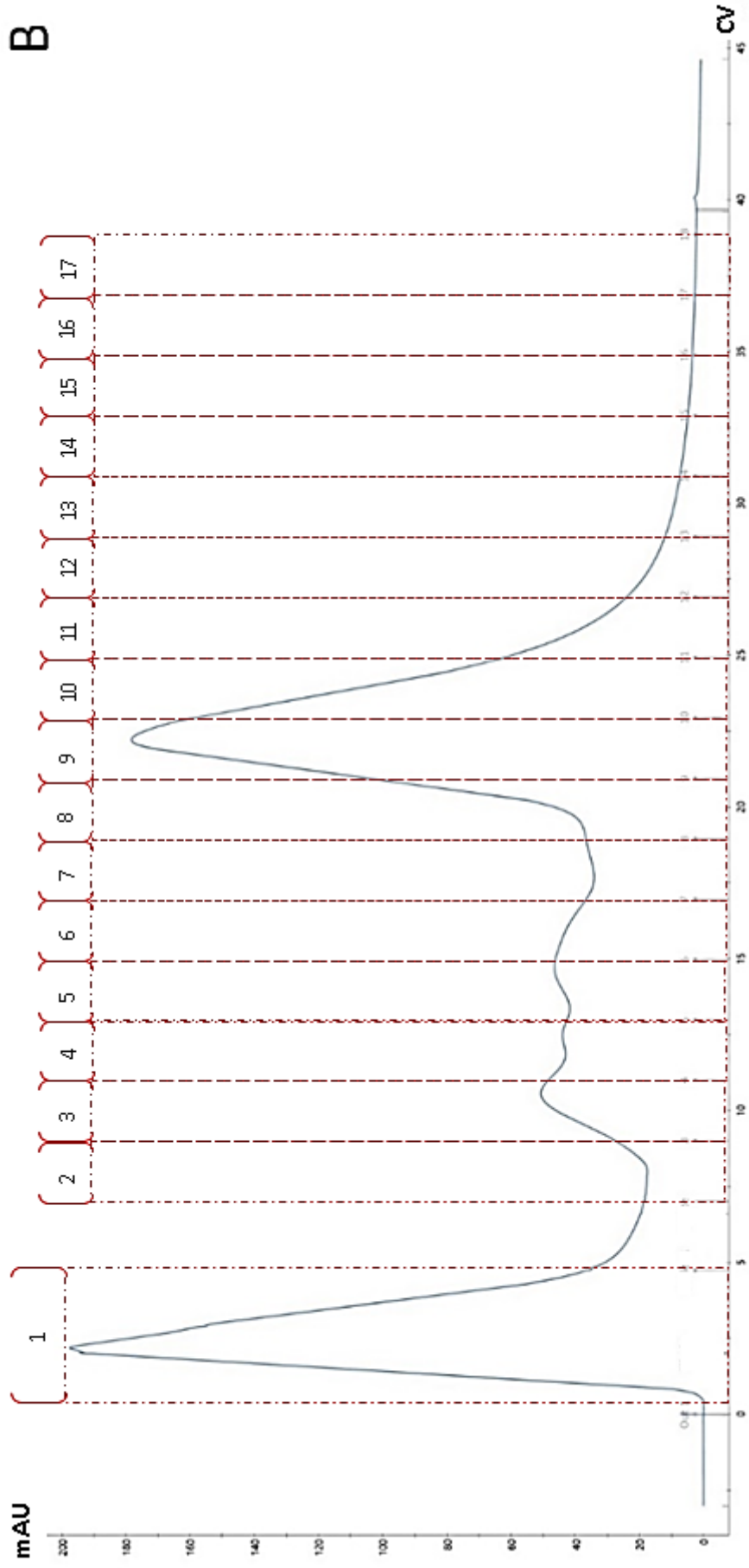


Şekil 3.2 devam ediyor

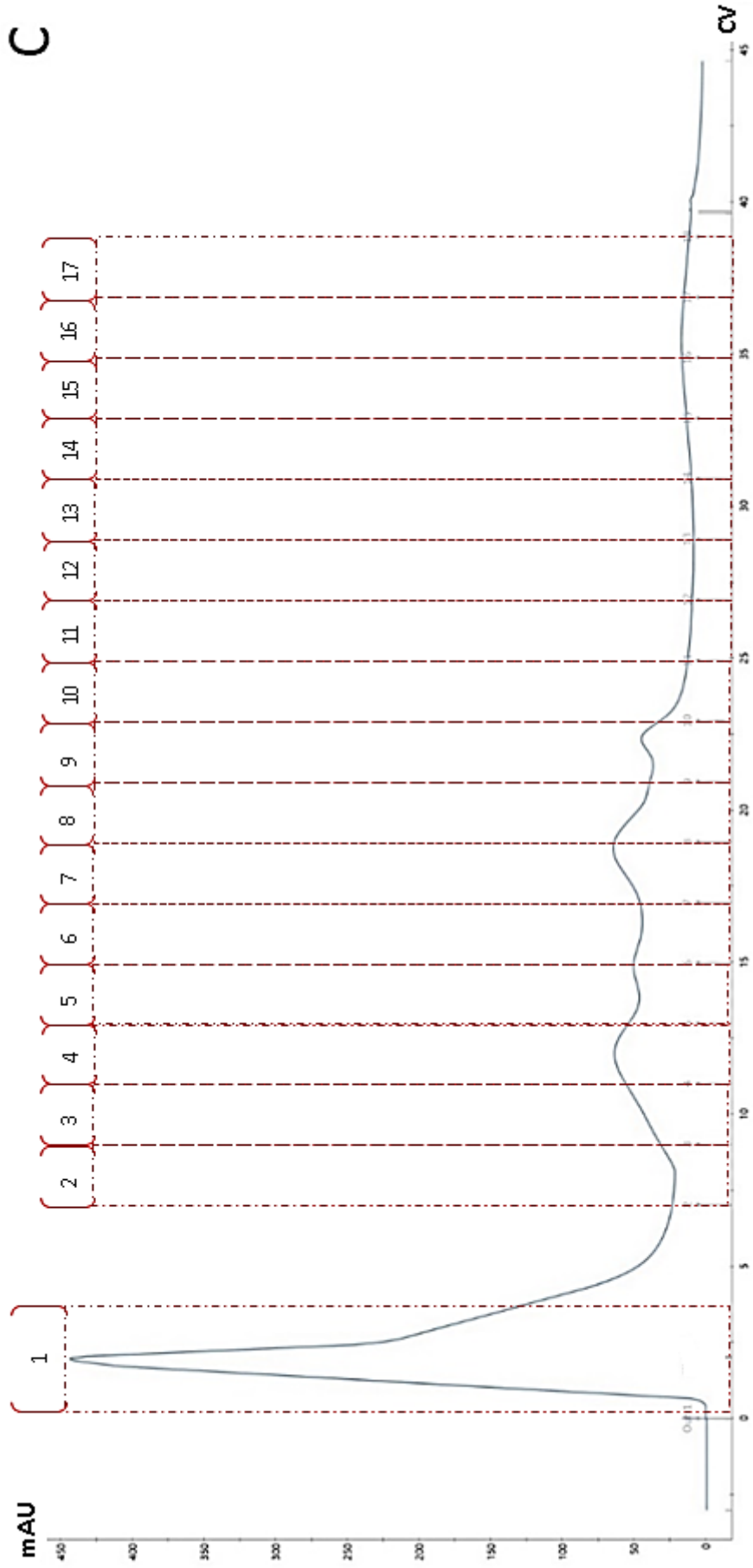
İyon değişim kromatografisi, proteinlerin yük türünü (katyonik veya anyonik) ve yük gücünü (güçlü veya zayıf anyonik-katyonik) temel alarak ayırım sağlamaktadır. İyon değişim kromatografisinde yüklü bileşikler ile reçineler arasındaki etkileşim iyonik bileşiğin boyutu, polarizasyon derecesi, yüzeyindeki yükü, reçinenin yapısı, çapraz bağlanma derecesi, iyon değişim kapasitesi, mobil fazın yapısı ve konsantrasyonu gibi özelliklerden etkilenmektedir (Pohl vd. 1997). Buna ek olarak kolon boyutunun da fraksiyonlamaya etkisi olduğu düşünölmektedir. Aynı tip kolonun farklı iki boyutunda aynı şekilde yapılan fraksiyon çalışmalarında Şekil 3.2’de göröldüğü üzere benzerliklerin yanı sıra farklılıklar da meydana gelmiştir. Özellikle 5 ml yatak hacimli Capto-Q kolonunda yapılan çalışmada tüm hidrolizat örneklerinde elüsyon işlemi 1 ml yatak hacimli kolona göre daha hızlı bir ayırım sağlamıştır. Buna bağlı olarak fraksiyonlanan örneklerin içerdiği bileşik çeşidi ve miktarlarında da farklılıklar olması beklenmektedir. Elde edilen şekillerin her birinin aynı kolon ile yapılan ayırımlarda dahi belirgin ölçüde farklılık arz etmesi, farklı enzimlerin yine belirgin ölçüde farklı parçalanmalara sebebiyet vermesi anlamına gelmektedir. Buna bağlı olarak, elde edilen fraksiyonların da kompozisyonlarının farklı olması ve farklı düzeylerde biyoaktivite göstermeleri mümkün olacaktır.



Şekil 3.3: Hidrolizat örneklerinin 100 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak 5 ml yatak hacimli Capto-Q anyon değişim kolonunda fraksiyonlanması (X: kolon hacmi-CV, Y: Absorbans-280 nm). (A) Tripsin hidrolizatlarının 32 CV elüsyonu, (B) Kimotripsin hidrolizatlarının 32CV elüsyonu, (C) Termolisin hidrolizatlarının 32CV elüsyonu



Şekil 3.3 devam ediyor

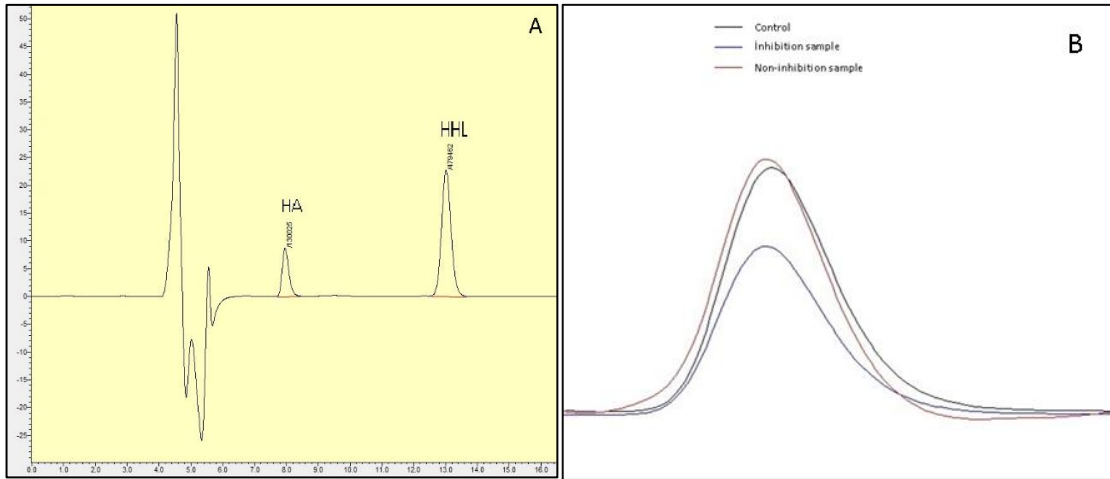


C

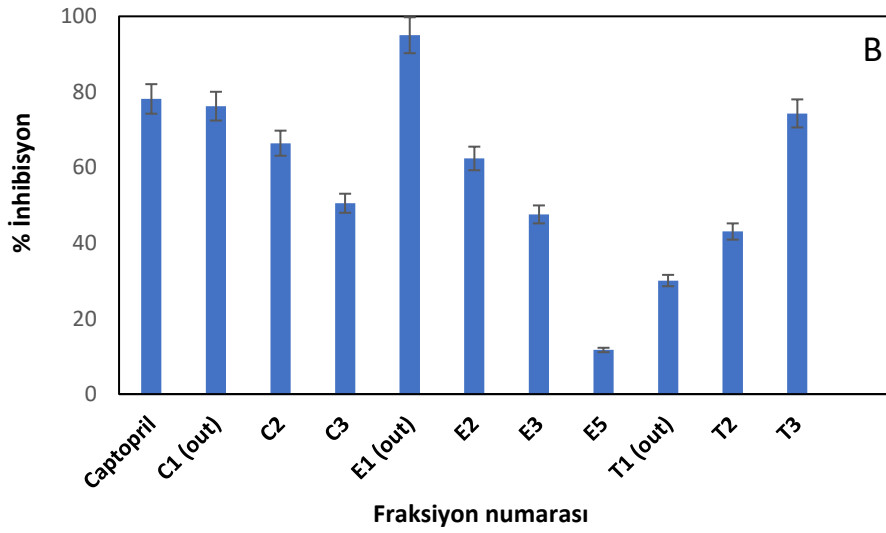
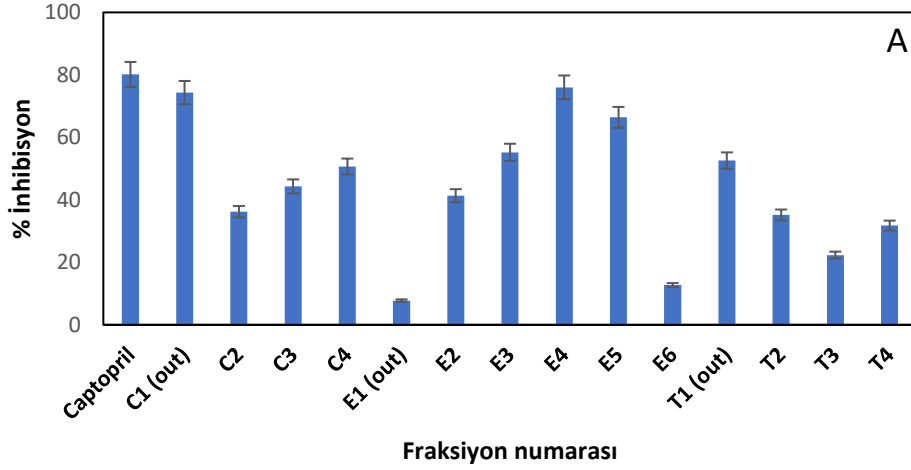
Şekil 3.3 devam ediyor

3.3. ACE-önleyici aktivite

Bu çalışmada fındık proteinlerinin antihipertansif özelliğini belirlemek amacıyla yapılan ACE-önleyici aktivite testi için Capto-Q 1 ml ve 5 ml kolon hacmine sahip iki kolondan da elde edilen fraksiyonlar, karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır. İyon değişimi kromatografisi yöntemine uygun olarak hazırlanan hidrolizat fraksiyonları, her 3 enzim için ayrı ayrı hazırlanarak ACE-önleyici aktivite testlerinde değerlendirilmiştir (Şekil 3.4). Çalışmada uygun bir HPLC yöntemi ile ACE inhibisyon aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Substrat olarak kullanılan Hippuril-His-Leu (HHL) bileşiğinin ACE etkisiyle parçalanması ile açığa çıkan hippürik asit (HA) konsantrasyon değerleri dikkate alınarak hesaplama yapılmıştır (Şekil 3.4A). İnhibitör içermeyen kontrol örneğinin maksimum HA konsantrasyon değerine sahip olduğu varsayılmıştır. Fraksiyon örneklerinin HA konsantrasyon değerleri kontrol örneği ile karşılaştırılarak örneklerin %ACE inhibisyon etkisi belirlenmiştir (Şekil 3.4B). İnhibisyon gösteren fraksiyon örneklerinin % ACE inhibisyon değerleri Şekil 3.5 üzerinde sunulmuştur.



Şekil 3.4: ACE testi HPLC kromatogramı (A) HA ve HHL bileşiklerine ait alıkonma kromatogramı, (B) HA molekülünün miktarına bağlı inhibisyon karşılaştırmasını içeren örnek kromatogram (X: zaman, Y: Absorbans-228 nm)



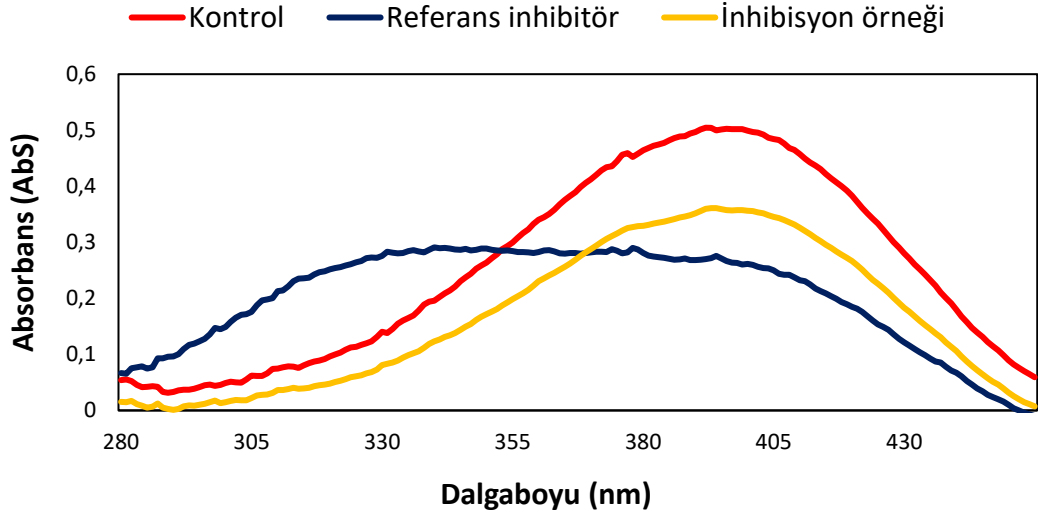
Şekil 3.5: Çeşitli proteazlar tarafından hidrolize edilmiş fındık posası peptit fraksiyonları için ACE inhibisyon aktivitesi. Fraksiyonlama, (A) Capto Q, 1 ml veya (B) Capto Q, 5 ml yatak hacimli kolon kullanılarak yapıldı. ACE inhibisyon testlerinde Kaptopril referans inhibitör olarak kullanıldı. Fraksiyon adları, aşağıdaki gibi kullanılan enzime dayanmaktadır: C; Kimotripsin hidrolizatlarından elde edilen fraksiyonlar (C1,C2,C3,C4). E: Termolisin hidrolizatlarından elde edilen fraksiyonlar (E1,E2,E3,E4,E5,E6). T; Tripsin hidrolizatlarından elde edilen fraksiyonlar (T1,T2,T3,T4). C1(out), E1(out) ve T1(out) kolona bağlanmayan bileşikleri içeren fraksiyonlardır.

Capto-Q 5 ml yatak hacimli kolonda yapılan fraksiyonlamanın daha hızlı gerçekleşmesine bağlı olarak ACE inhibisyonu gösteren bazı bileşiklerin 1 ml yatak hacimli kolona göre daha erken fraksiyonlanması mümkün olmuştur. Bu sebeple 5 ml yatak hacimli kolonda inhibisyon gösteren fraksiyon sayısı, 1 ml yatak hacimli kolona göre daha az olmuştur. Ancak 5 ml yatak hacimli kolonda daha yüksek inhibisyon aktivite gösteren fraksiyonlar toplanmıştır (Şekil 3.5B). ACE inhibisyon aktivitesi tüm

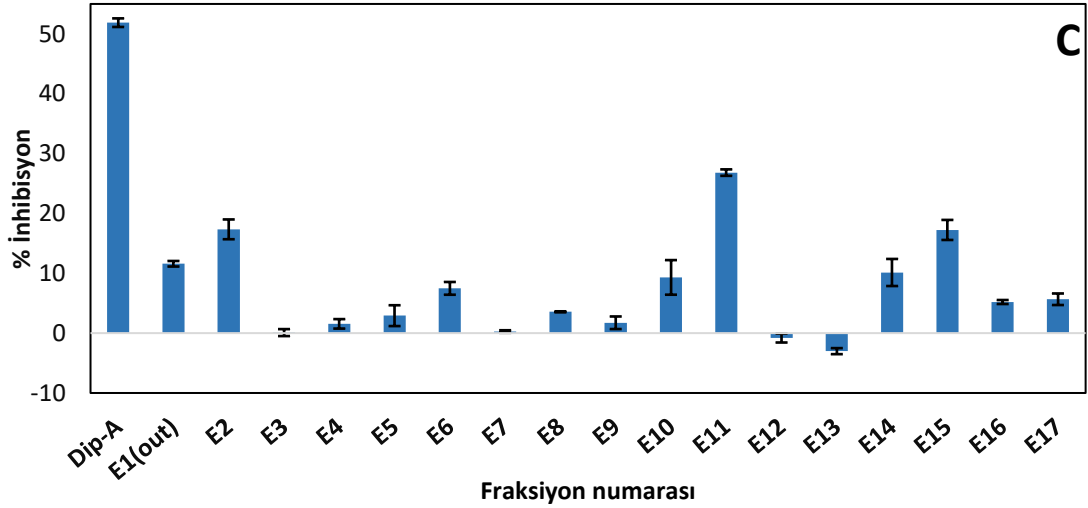
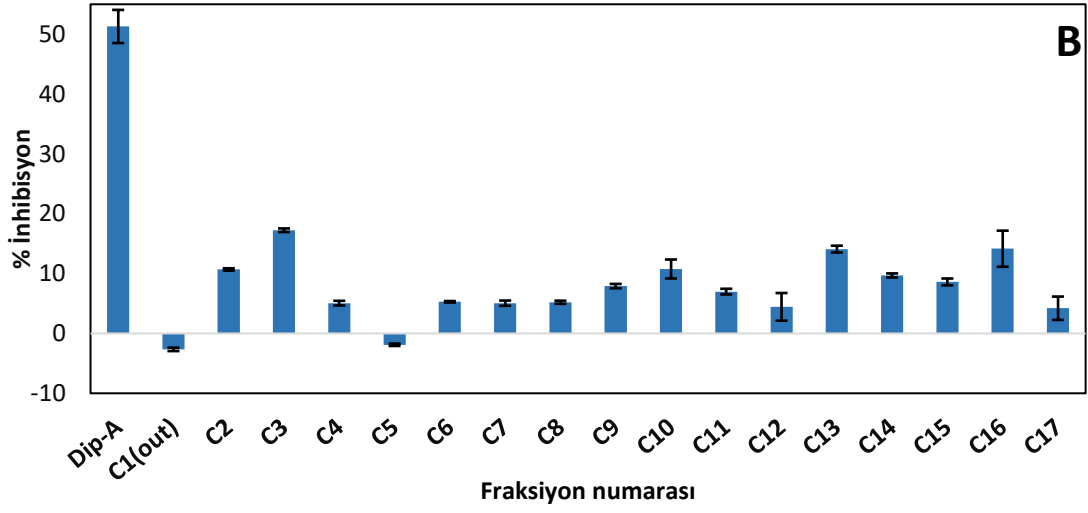
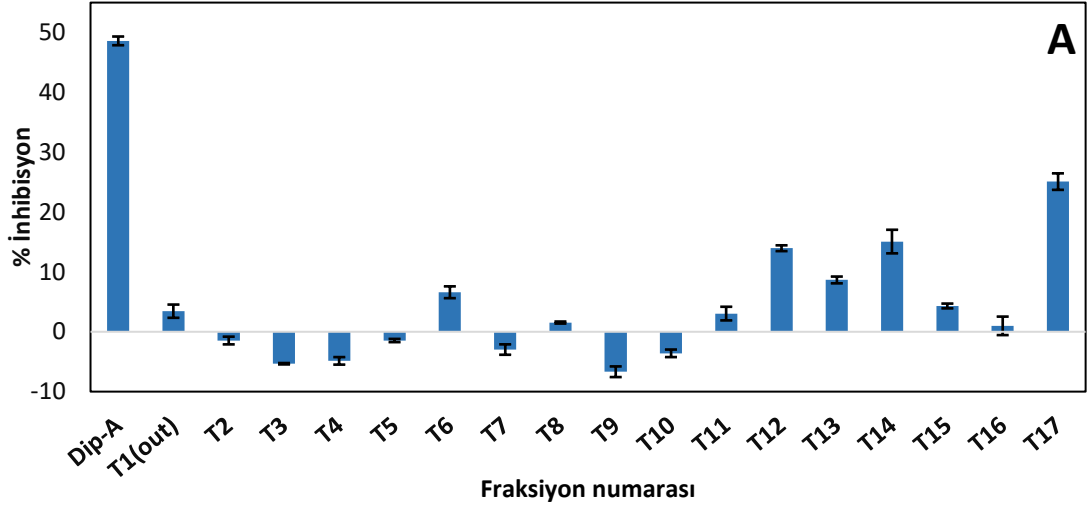
hidrolizat örneklerinde Şekil 3.5’de gösterildiği üzere kolona bağlanmayan ve/veya zayıf anyonik özellik gösteren bileşiklerin olduğu fraksiyonlar da görülmüştür. Benzer sonuçlar Liu vd. (2018a) tarafından yapılan çalışmada da bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada katalaz enzimiyle hidroliz edilen ve iyon değişim kromatografisi ile ayrıştırılan fındık peptitlerinde en yüksek ACE inhibisyonu zayıf asidik peptitleri içeren ilk fraksiyonda gözlemlenmiştir. Tüm bu bulgular göz önüne alındığında, özellikle kolona bağlanmayan bileşikleri içeren fraksiyonlarda pozitif yüklü amino asitleri içeren peptitlerin varlığı ve ACE inhibisyonuna olumlu etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir araştırmada bazı kazein kaynaklı inhibitörlerde (kasokininler), bradikinin ve bazı sentetik inhibitörlerde pozitif yüklü C-terminal lizin veya arginin varlığının ACE inhibisyonuna önemli ölçüde katkı sağladığı bulunmuştur (Meisel, 1993). Bu durum Ondetti ve Cushman (1982) tarafından belirtilen ACE aktif alan modeline uymamaktadır. Bu sebeple ACE inhibisyon mekanizmasında enzimin katalitik bölgesinden farklı bir anyonik inhibitör bağlanma bölgesinde etkileşimin olduğu iddia edilmektedir (FitzGerald ve Meisel, 2000).

3.4. DPP-IV önleyici aktivite

Bu çalışmada fındık proteinlerinin antidiyabetik özelliğini belirlemek amacıyla yapılan DPP-IV önleyici aktivite testi için 5 ml yatak hacimli Capto-Q kolonunda 100 mM Tris-HCl pH:8 tamponu kullanılarak elde edilen fraksiyonlar kullanılmıştır (Şekil 3.3). Tripsin, kimotripsin ve termolisin hidrolizatlarının anyon değişimi bazlı fraksiyonlanmasının ardından fraksiyonların DPP-IV önleyici aktivitelerini belirlemek için Nongonierma vd. (2018) tarafından tarif edilen analiz yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Referans inhibitör olarak Diprotin-A (dip-A) kullanılmıştır. DPP-IV enziminin Gly-Pro-pNA substratını parçalaması ile açığa çıkan pNA miktarı 405 nm dalga boyunda Shimadzu® BioSpec NanoDrop spektrofotometresi (Shimadzu, ABD) ile ölçülmüştür. Kontrol örneğinin maksimum pNA konsantrasyonuna sahip olduğu varsayılarak fraksiyon örnekleriyle karşılaştırılmıştır (Şekil 3.6). Fraksiyonların %DPP-IV aktiviteleri Şekil 3.7 üzerinde verilmiştir.



Şekil 3.6: DPP-IV inhibisyonu karşılaştırması için örnek spektrum. Karşılaştırma için 405 nm’de absorban değerleri esas alınmıştır. Referans inhibitör olarak Diprotin-A kullanılmıştır.



Şekil 3.7: Hidrolizat fraksiyonlarının % DPP-IV inhibisyonu (X: fraksiyon numarası, Y: %inhibisyon) (A) Tripsin hidrolizat fraksiyonları (B) Kimotripsin hidrolizat fraksiyonları (C) Termolisin hidrolizat fraksiyonları (Dip-A: referans inhibitör)

Her bir hidrolizat örneğinden alınan fraksiyonların DPP-IV inhibisyon aktiviteleri Şekil 3.7 üzerinde sunulmaktadır. Tripsin hidrolizat fraksiyonlarında inhibisyon gösteren örnekler genellikle T10-T17 aralığındaki güçlü anyonik bileşikler içeren fraksiyonlarda gözlemlenmiştir (Şekil 3.7A). Bu fraksiyonlar arasından en yüksek DPP-IV inhibisyon aktivitesi gösteren % 25,06±2 ile T17 fraksiyonu olmuştur. Kimotripsin hidrolizat fraksiyonlarında, kolona bağlanmayan bileşikler içeren C1 (out) fraksiyonu ve C5 fraksiyonu hariç tüm fraksiyonlarda aktivite gözlemlenmiştir (Şekil 3.7B). Bu fraksiyonlar arasından % 17,25±1,2 inhibisyon oranı ile zayıf anyonik bileşikler içeren C3 fraksiyonu en yüksek DPP-IV inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Termolisin hidrolizat fraksiyonlarında en yüksek DPP-IV inhibisyon aktivitesi gösteren % 26,82±0,8 ile E11 fraksiyonu olmuştur. Ayrıca E11 tüm hidrolizatlar arasında en yüksek aktiviteyi gösteren fraksiyon olmuştur. Elde edilen sonuçlar, Gülseren (2018) tarafından yapılan *in silico* değerlendirmesiyle uyumludur. Gülseren (2018) tarafından yapılan çalışmada fındık (*Corylus avellana* L.) peptitlerinin biyolojik fonksiyonelliğini değerlendirmek için 23 ribozomal protein üzerinde *in silico* çalışma yapılmıştır. Biyoaktif peptitlerin üretiminde, termolisin, papain ve bromelain proteazlarının gastrointestinal proteazlara (tripsin, pepsin, kimotripsin) kıyasla çoğu durumda daha etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Lacroix ve Li-Chan (2012b) tarafından yapılan çalışmada sodyum kazeinat ve whey proteinlerinin 11 farklı proteaz kullanılarak üretilen hidrolizatlarında DPP-IV inhibisyon aktivitesi incelenmiştir. Bu iki protein için en yüksek aktiviteyi termolisin hidrolizatları göstermiştir (sırasıyla %50 ve %51). Bu durum termolisin proteazının, DPP-IV inhibe edici biyoaktif peptitlerin üretilmesinde önemli bir katkısı olduğunu göstermektedir.

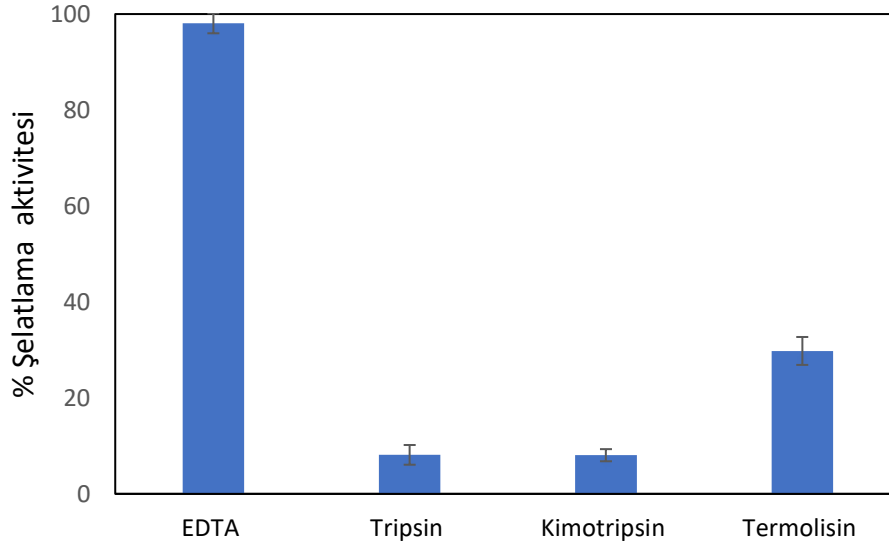
3.5. Antioksidatif aktivite testleri

Antioksidatif aktivite testleri için 5 ml yatak hacimli Capto-Q kolonunda 20 mM Tris-HCl pH:8.3 tamponu kullanılarak elde edilen fraksiyonlar kullanılmıştır (Şekil 3.2).

3.5.1. Demir şelasyon aktivitesi

Protein hidrolizatlarının, Fe²⁺ iyonlarını şelatlama kapasitesi Dinis vd. (1994) yöntemine uygun olarak belirlenmiştir. Fe²⁺-ferrozin kompleksinin oluşturduğu magenta renk 562 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Antioksidatif peptitlerin demir iyonlarını bağlaması, magenta rengin ve absorbans değerinin giderek azalmasına neden olur. Tampon çözeltilerin analiz sonuçlarını engellemesi sebebiyle

bu test için tampon çözelti kullanılmadan proteinler hidroliz edilmiş ve fraksiyonlama işlemi yapılmadan doğrudan hidrolizat örnekleri kullanılmıştır. Kontrol örneği olarak hidrolizat örneğinin yerine deiyonize su kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak EDTA kullanılmıştır. Demir şelasyon aktivitesi, hidrolizat örneklerinin absorpsiyon değerleri kontrol örneği ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Örneklerin % şelatlanma kapasiteleri Şekil 3.8 üzerinde verilmiştir.

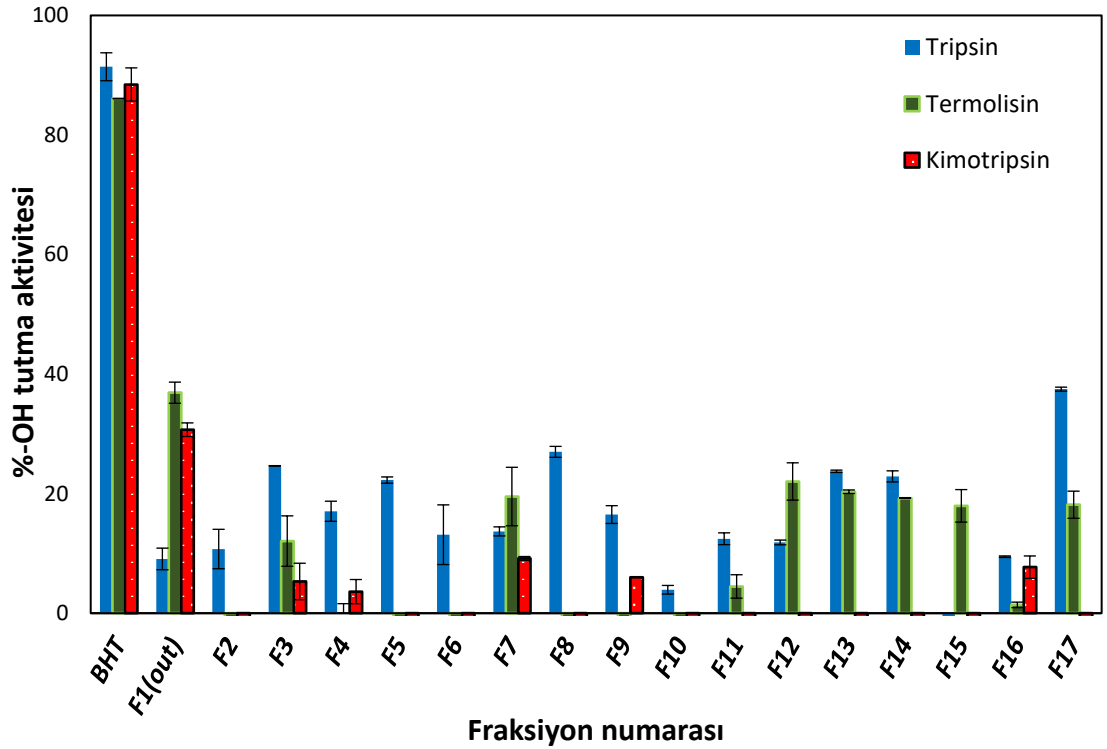


Şekil 3.8: Çeşitli proteazlar tarafından hidrolize edilmiş fındık hidrolizatlarının % şelatlanma kapasitesi. Hidrolizatlar %1 protein içerecek şekilde saf su içerisinde pH 8'e ayarlanarak hazırlanmış ve tripsin, kimotripsin ve termolisin proteazları kullanılmıştır. EDTA (100 µg/ml) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Şekil 3.8'de %1 konsantrasyona sahip protein hidrolizatlarının Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesi karşılaştırıldığında yaklaşık 30 ± 2 ile en yüksek aktiviteyi termolisin hidrolizatı göstermiştir. Tripsin ve kimotripsin hidrolizatları yaklaşık %8 ile benzer şelatlama aktivitesi göstermişlerdir. EDTA çalışılan en düşük konsantrasyonu 100 µg/ml'de dahi 98 ± 2 şelatlama aktivitesi göstermiştir. Torres-Fuentes vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada nohut proteinlerinde sindirim enzimleri kullanılarak elde edilen hidrolizatlarda demir şelasyon aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmada hidrolizatlar yaklaşık %10 aktivite göstermiş ve pozitif kontrol EDTA 100 µg/ml konsantrasyonda 99 ± 1 aktivite göstermiştir. Bu bağlamda elde edilen sonuçlar literatürle uyumludur.

3.5.2. Hidroksil radikali tutma aktivitesi

Hidroksil radikali düşük pH değerlerinde tiyobarbitürik asit ile ısıtıldıktan sonra pembe bir kromojen veren ürünler oluşturmak üzere deoksiriboz ile tepkimeye girer. Eklenen hidroksil radikal tutucu bileşikler (örneğin, antioksidatif peptitler) üretilen hidroksil radikalleri için deoksiriboz ile rekabet eder ve kromojen oluşumunu azaltır (Halliwell vd.1987). Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi Halliwell vd. (1987) tarafından gerçekleştirilen yöntemine uygun olarak yapılmıştır. BHT (0,03 mg/ml), bu deneyde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Fraksiyonlar alınma sıralarına göre numaralandırılarak numunelerin hidroksil radikali tutma aktiviteleri Şekil 3.9 üzerinde ortak olarak gösterilmiştir.



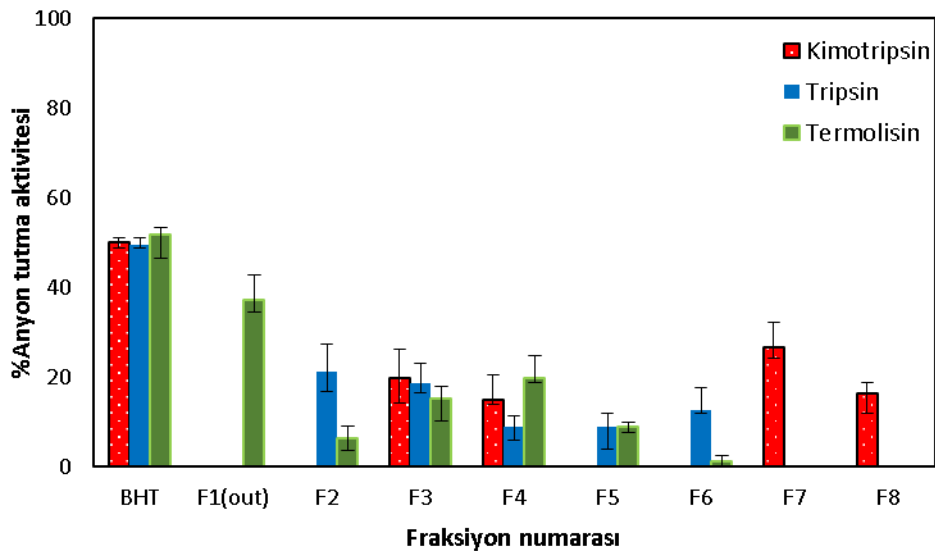
Şekil 3.9: Çeşitli proteazlar tarafından hidroliz edilmiş fındık peptit fraksiyonlarının hidroksil radikali tutma aktivitesi. Örnekler Capto-Q 5 ml yatak hacimli kolonda 20mM Tris-HCl (pH 8,3) tamponu kullanılarak 2 CV aralıklarla fraksiyonlanmış ve 17 fraksiyon toplanmıştır (F1-F17). BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Fraksiyonların hidroksil radikali tutma aktivitesi karşılaştırıldığında tripsin hidrolizatından elde edilen F17 fraksiyonu % 37,48±0,7'lik bir oranla en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Bu oranı % 36,9±1,7 ile termolisin F1 ve % 30,7±1,3 ile kimotripsin F1 fraksiyonları takip etmiştir. Pozitif kontrol 0,136 mM BHT % 88,4±2

aralığında aktivite göstermiştir. Fraksiyonların bir kısmında aktivite gözlemlenmez iken birçok fraksiyondan düşük aktivite değerleri elde edilmiştir. Toplamda elde edilen 51 fraksiyondan 31 tanesinde aktivite gözlenmiş ve bunların içinden sadece 10 tanesi %20 üzerinde aktivite göstermiştir. Fraksiyonlamamanın kısa aralıklarla yapılmasına bağlı olarak bazı ardışık fraksiyonların kompozisyonlarının benzer içeriğe sahip olabileceği ve güçlü anyonik fraksiyonların demir şelatlamaya bağlı olarak aktivite göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

3.5.3. Süperoksit anyon tutma aktivitesi

Pirogallol sulu çözeltide hızla otoksidize olan bir reaktiftir. Çözeltide ilk önce 400 - 425 nm arasında maksimum absorbans gösteren sarı-kahverengi rengi oluşturmaktadır. Oda sıcaklığında saklama esnasında birkaç dakika sonra renk yeşile dönmeye başlar ve son olarak, birkaç saat sonra sarı bir renk görünür. Absorbans değerindeki artış ile oksijen tüketimi arasında sabit bir ilişki bulunmaktadır (Marklund ve Marklund,1974). Bu çalışmada Marklund ve Marklund (1974) tarafından yayınlanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. BHT (0,03 mg/ml), bu deneyde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Süperoksit anyon tutma aktivitesi gösteren fraksiyonlar Şekil 3.10 üzerinde ortak olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.10: Çeşitli proteazlar tarafından hidroliz edilmiş fındık peptit fraksiyonlarının süperoksit anyon tutma aktivitesi. Örnekler Capto-Q 5 ml yatak hacimli kolonda 20 mM Tris-HCl (pH 8,3) tamponu kullanılarak 2 CV aralıklarla fraksiyonlanmış ve 17 fraksiyon toplanmıştır (F1-F17). BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Süperoksit anyon tutma aktivitesi testinde değerlendirilen hidrolizat örnekleri arasında F9-F17 aralığındaki fraksiyonlarda aktivite gözlemlenmemiştir. Bu durumun F9-F17 aralığındaki fraksiyonlarda güçlü anyonik özellik gösteren bileşiklerin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Süperoksit anyon tutma aktivitesi gösteren fraksiyonlar karşılaştırıldığında termolisin hidrolizatından elde edilen F1(out) fraksiyonu %37,4±3,7 ile en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Bu oranı % 26,7±3,8 ile kimotripsin F7 fraksiyonu takip etmiştir. Pozitif kontrol BHT (0,03 mg/ml) ise % 50,5±1,5 oranında aktivite göstermiştir. Oktay vd. (2003) tarafından yapılan çalışmada BHA ve BHT'nin süperoksit anyon radikali tutma IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 0.031 ve 0.061 mg/ml olduğunu bildirmiştir. Bu değerlere göre BHT'nin aktivitesi Oktay vd. (2003) tarafından yapılan çalışmaya kıyasla iki kat fazla bulunmuştur. Bu durum kullanılan kimyasallar, inkübasyon süresi, pH, ortam sıcaklığı gibi birçok metot farklılıklarından kaynaklanabilmektedir. Bu bağlamda sonuçların literatüre uygunluğu net bir biçimde kıyaslanamamıştır.

Fındık protein konsantrelerinden termolisin, kimotripsin, tripsin proteazları kullanılarak elde edilen hidrolizatlar ve fraksiyonlarda yapılan antioksidan aktivite testlerinde genel olarak düşük aktiviteler gözlemlenmiştir. En yüksek antioksidan aktivite hidroksil radikali tutma testinde % 37,48±0,7 ile tripsin F17 ve % 36,9±1,7 ile termolisin F1(out) fraksiyonlarında gözlemlenmiştir. Ancak güçlü anyonik bileşikleri içeren tripsin F17 fraksiyonunun metal şelatlayıcı özellik göstererek Fe⁺²'nin aktivitesini değiştirmiş olabileceği ve bu sebeple yüksek aktivite gösterdiği düşünülmektedir. Sonuçların bazik pH değerlerinde anyon değişim kromatografisi kullanılarak ve uzun elüsyon (32 CV) çalışmalarında kısa aralıklarla fraksiyonlanan (2 CV) anyonik peptitlerden elde edildiği göz önünde bulundurulmalıdır. Fraksiyonlamanın kısa aralıklarla yapılmasına bağlı olarak bazı ardışık fraksiyonların kompozisyonlarının benzer içeriğe sahip olabileceği ve ayrıca güçlü anyonik bileşikleri içeren fraksiyonların metal şelatlayıcı olarak antioksidan aktivite göstermiş olabileceği düşünülmektedir. LC-MS/MS analizi sonuçlarına göre özellikle C2 ve C3 fraksiyonları (kimotripsin F2 ve F3) 1 peptit haricinde aynı peptit içeriğine sahip olduğu gözlemlenmiştir (bkz. Ek-2). Dolayısıyla bu durum LC-MS/MS analizi yapılmayan fraksiyonlarda da benzer durumların olabileceğini göstermektedir. Gülseren (2018) tarafından fındık (*Corylus avellana* L.) peptitleri üzerine yapılan *in*

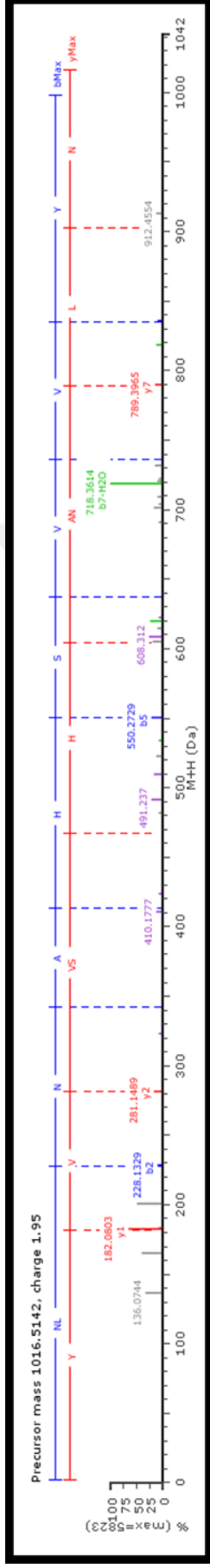
silico çalışmada, antioksidan aktivitenin bir dereceye kadar gözlemlenebileceği ve diğer biyoaktivitelere (örneğin, ACE-önleyici ve DPP-4 önleyici aktivitelere) kıyasla daha az sıklıkta olduğu tahmin edilmiştir. 178 proteolitik senaryo içerisinde sadece 44 vakada antioksidan aktivite öngörülmüştür (yaklaşık %25). Bu bağlamda yapılan *in vitro* çalışma *in silico* tahminleriyle paralellik göstermektedir.

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

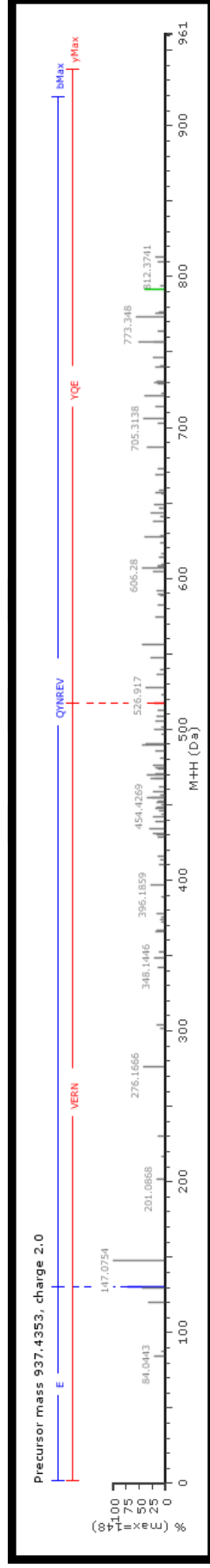
Bölüm 2.2.10'da tarif edildiği üzere ACE aktivitesi gösteren fraksiyonlar toplanarak uygun LC-MS/MS analiz teknikleriyle incelenmiştir. Çalıştığımız fındık proteinlerinden elde edilen enzimatik hidrolizatların fraksiyonları alındıktan sonra peptit yapılarını aydınlatmak için LC-Q-TOF-MS sisteminde analizler tamamlanmıştır. Analiz edilen peptit moleküllerinin Uniprot, PLGS, vb. veri bankalarındaki proteinlerle eşleştirerek peptit moleküllerinin yapıları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ancak bazı peptit moleküllerinin yapıları bu yolla belirlenememiştir. LC-MS/MS analizi sonucu elde edilen bazı örnek spektrumlar aşağıda sunulmaktadır (Şekil 3.11- 3.13). ACE aktif fraksiyonlarda bulunmuş 192 farklı peptit spektrumu olması sebebiyle sadece örnek birkaç sunum verilmiştir.

Uygun tekniklerle dizilimleri belirlenen peptitlerin fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesi literatürde bulunan *in silico* yöntemler kullanılarak yürütülmüştür. Analizde kullanılan *in silico* yöntemler hakkında detaylı bilgi bölüm 2.2.11'de verilmiştir.

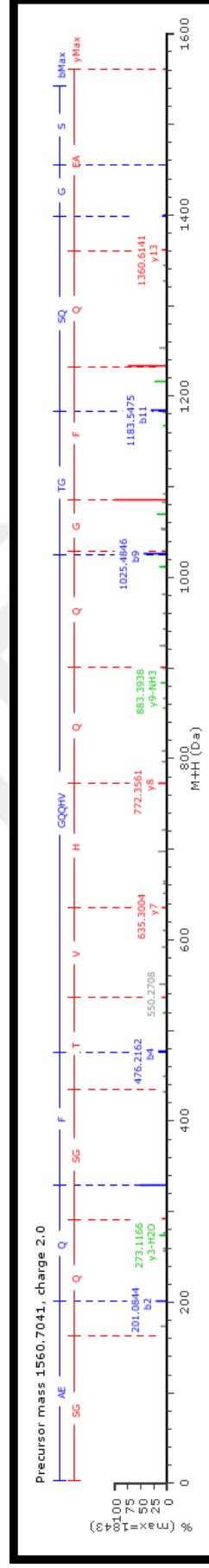
ACE aktif fraksiyonlardan analizi tamamlanmış 192 farklı peptit bulunmaktadır. Tripsin, kimotripsin ve termolisin hidrolizatlarından elde edilen bu peptitlerin değerlendirmeleri Ekler bölümünde sırasıyla Ek-1 Ek-2 ve Ek-3' te verilmiştir. Mooney vd. (2012) referansına göre (PeptideRanker) bu peptitlerin muhtemel biyoaktiviteleri sıralanmıştır. Bunun yanında, Minkiewicz vd. (2008) referansına göre, peptitlerin (eğer varsa) ACE inhibisyon potansiyelleri incelenmiştir. Bu bağlamda hem *in vitro* ACE aktivitesi bulgularan, hem de bu aktiviteleri *in silico* tekniklerce doğrulan peptitlerin ACE inhibisyon mekanizması incelenmiştir (Trabuco vd. 2012). Her bir hidrolizat için en etkin (muhtemel) aktiviteye sahip peptit sekansları ve PeptideRanker değerleri Tablo 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.11: C2 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum NLNAHSVY peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.



Şekil 3.12: E2 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum EQYNREV peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.



Şekil 3.13: T3 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum AEQFGQQHVTSQQGS peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.

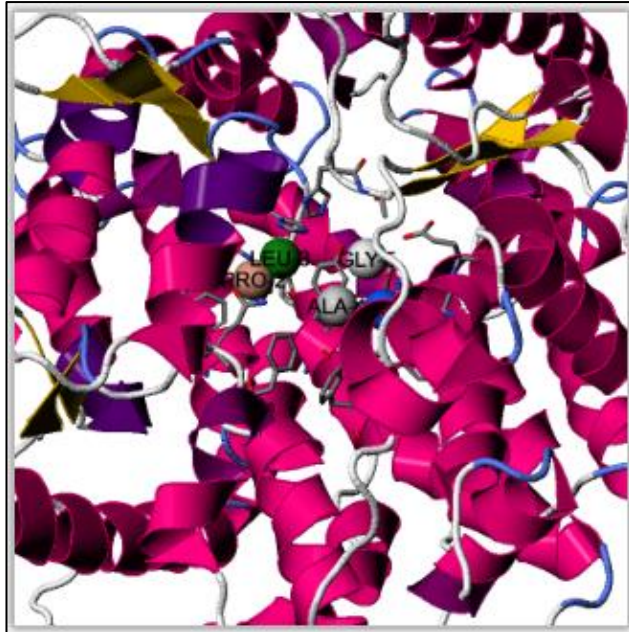
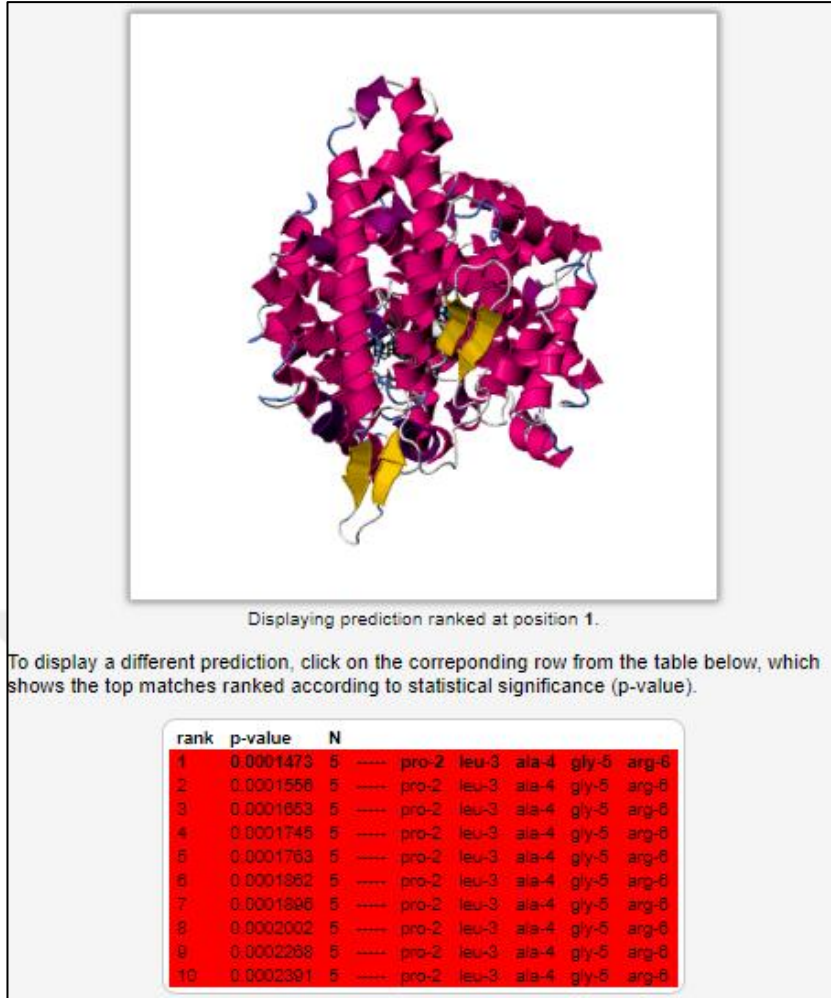
Değerlendirmeler sonucunda, aktif fraksiyonlarının tamamına yakınında hem aktif hem de aktif olmayan peptitlerin bulunduğu anlaşılmıştır. Ekler bölümünde verilen tablolar (Ek 1-2-3) üzerinden incelenebileceği gibi peptitlerin hiçbirinde toksik etkiler ortaya çıkması beklenmemektedir. Buna ek olarak, bazı alerjen proteinlerin de parçalandığı ve muhtemelen alerjik etkilerinin azalabileceği anlaşılmaktadır. Alerjik olmayan proteinlere ilişkin bazı parçalanmalar da söz konusudur. Bunun dışında, genellikle out fraksiyonları beklendiği üzere daha fazla aktif peptit içeriğine sahiptir. Yine de bazı istisnalar her iki durum için de söz konusudur. Dolayısıyla, hem out fraksiyonlarda bazik olmayan peptitler görülmüş, hem de out olmayan fraksiyonlarda sayıca az bazik peptitler bulunmuştur. Bu durum, peptitlerin birbirleri ile etkileşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca kısa fraksiyonlama aralığına bağlı olarak aynı peptit sekansına sahip bazı ardışık fraksiyonlar da gözlemlenmiştir. Ek-2’de gözlenen peptitlerin C2 ve C3 fraksiyonları için, 1 peptit dışında, ortak olduğu anlaşılmıştır.

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

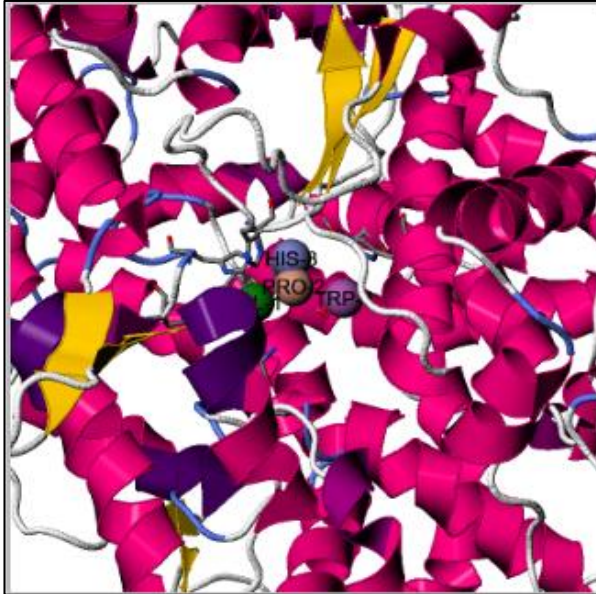
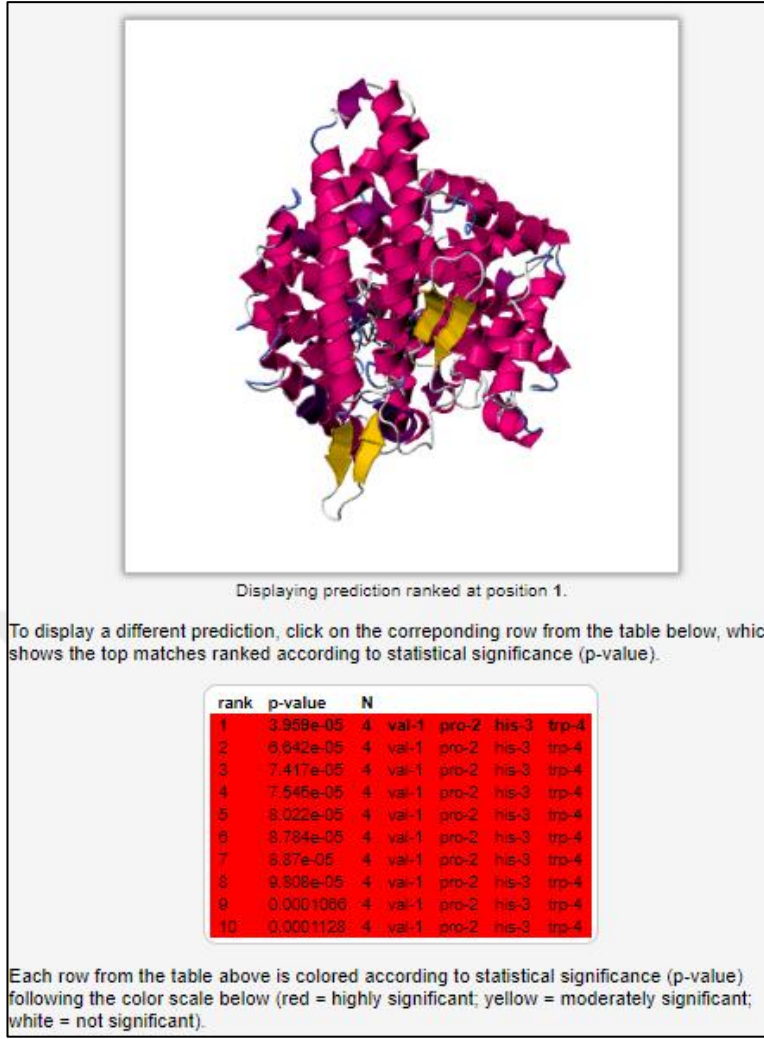
Tablo 3.1: Her bir hidrolizat için en etkin (PeptideRanker değerine göre) peptit sekansları.

Hidrolizat adı	Fraksiyon numarası	Sekanslar	Moleküler ağırlık (g/mol)	Kaynak proteini	Peptide Ranker skoru	pI
Tripsin	T out	SPLAGR	600,3462	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	0,615224	10,1
Kimotripsin	C2 & C3	VPHW	538,2772	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	0,79343	7,37
Termolisin	E out	PGHF	457,2194	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	0,950238	7,1

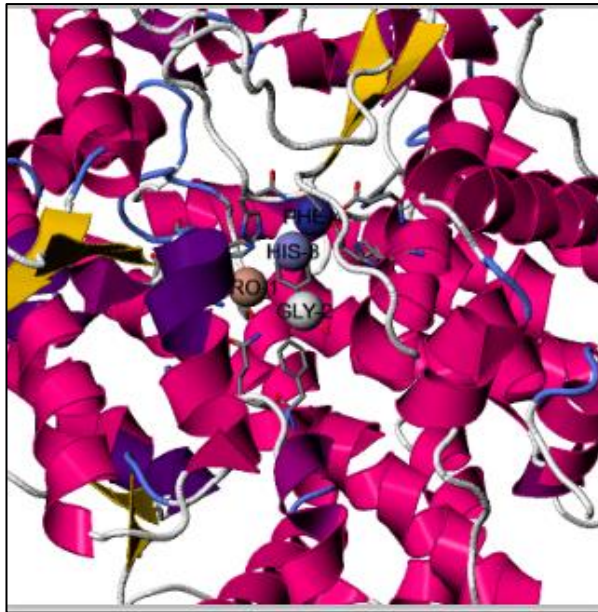
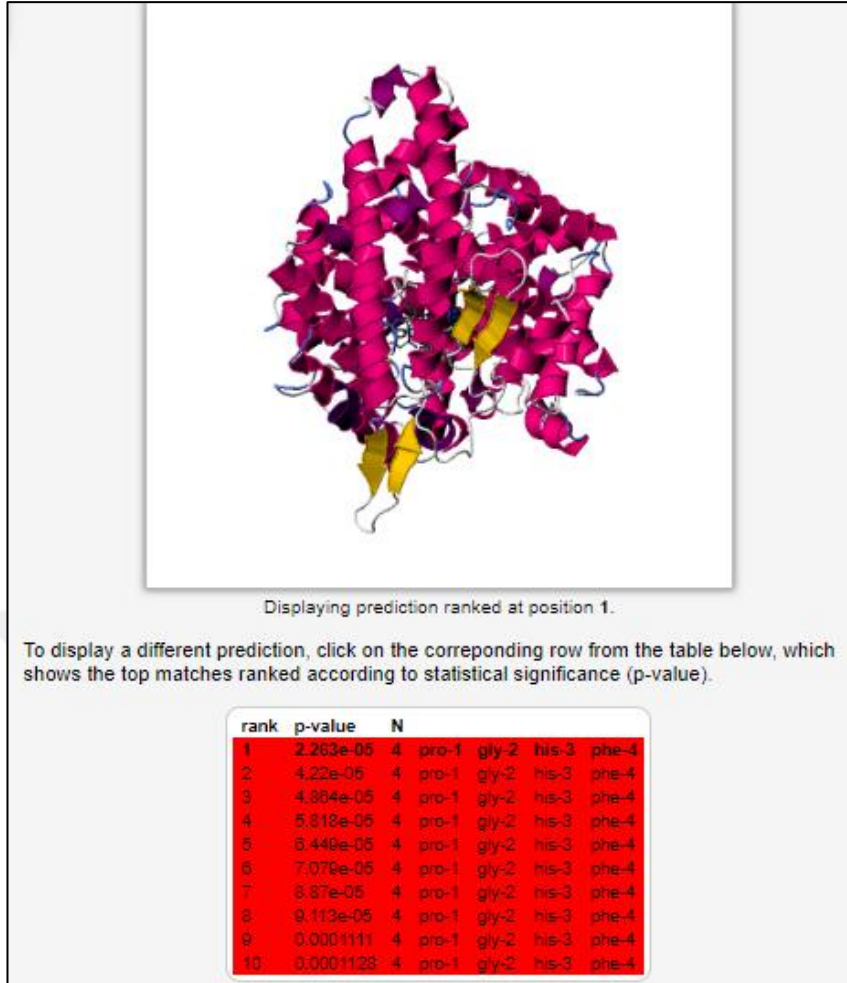
Sekansları Tablo 3.1’de verilen peptitlerin ve diğer ACE aktif 189 peptidin daha detaylı verileri Ekler bölümünde verilmiştir (Ek-1, Ek-2, Ek-3). Aşağıdaki şekil ve tablolarda SPLAGR, VPHW ve PGHF peptitlerinin ACE ile etkileşim mekanizması incelenmiş ve bu inhibitörlerin ACE’nin hangi amino asitleri ile etkileşebileceği özetlenmiştir.



Şekil 3.14: Triptik peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan SPLAGR peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Üstte enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, alttaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.



Şekil 3.15: Kimotriptik peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan VPHW peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Üstte enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, alttaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.



Şekil 3.16: Termolisin muamelesi ile hazırlanan peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan PGHF peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Üstte enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, alttaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

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

Tablo 3.2: SPLAGR peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

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

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

Tablo 3.3: VPHW peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

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

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

Tablo 3.4: PGHF peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

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

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

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

Tablo 3.5: Mevcut peptitlerin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi ve bu listelerin VPP peptidine ait liste ile kıyaslanması.

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

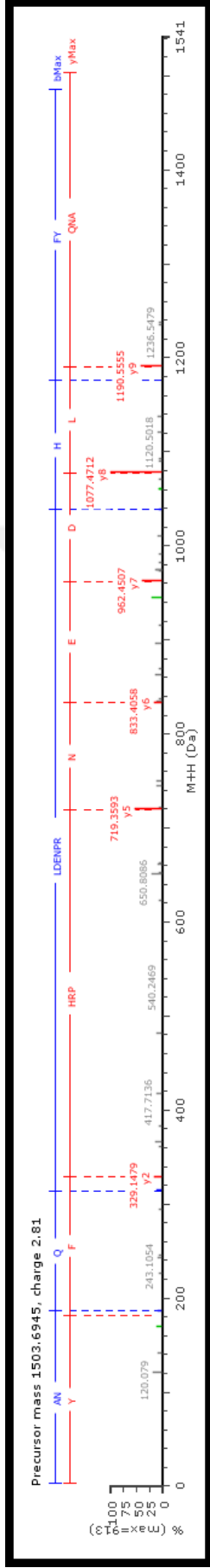
Bu durumda VPP peptidinin bağlanabileceği 14 farklı amino asit belirlenmiştir. Bu bağlantı noktalarından 11 tanesi mevcut 3 peptit ile ortaktır. Öte yandan, koyu renkle gösterilen üç amino bağlantısı (His387, His410 ve Ala 412) VPP tripeptidine spesifiktir.

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

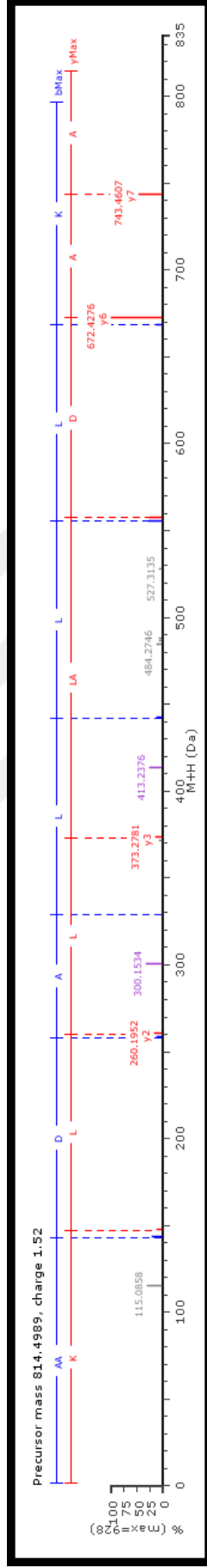
Çalıştığımız fındık proteinlerinden elde edilen enzimatik hidrolizatların fraksiyonlarını aldıktan sonra peptit yapılarını aydınlatmak için LC-Q-TOF-MS sisteminde analizler tamamlanmıştır. Analiz edilen peptit moleküllerinin Uniprot, PLGS, vb. veri bankalarındaki proteinlerle eşleştirilerek peptit moleküllerinin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

Önceki bölümlerde (tripsin, kimotripsin ve termolisin muameleleri) tarif edildiği üzere DPP-IV aktivitesi gösteren fraksiyonlar toplanarak uygun LC-MS/MS analiz teknikleriyle incelenmiştir. Bu bağlamda elde edilen bazı örnek spektrumlar aşağıda sunulmaktadır (Şekil 3.17-3.18). Analiz tekniğinin detayları bölüm 2.2.10’da sunulmuştur. Çözülebilmiş olan peptit fraksiyonlarına ait 14 farklı peptidin sonuçları Ekler bölümünde Ek-4 ve Ek-5’te verilmiştir. Bu peptitler C10 ya da T12 fraksiyonlarında bulunmuştur.

Değerlendirmeler sonucunda, aktif fraksiyonlarının tamamına yakınında hem aktif hem de aktif olmayan peptitlerin bulunduğu anlaşılmıştır. Mooney vd. (2012) referansına göre (PeptideRanker) peptitlerin muhtemel biyoaktiviteleri sıralanmıştır. Bunun yanında, Minkiewicz vd. (2008) referansına göre, peptitlerin (eğer varsa) DPP-IV inhibisyon potansiyelleri incelenmiştir. DPP-IV için A ve B parametreleri olmayan peptitlerin ACE parametreleri Ek-4’te sunulmuştur. Ek-4 ve Ek-5’te incelenebileceği gibi peptitlerin hiçbirinde toksik etkiler ortaya çıkması beklenmemektedir. Buna ek olarak, bazı alerjen proteinlerin de parçalandığı ve muhtemelen alerjik etkilerinin azalabileceği anlaşılmaktadır. Alerjik olmayan proteinlere ilişkin bazı parçalanmalar da söz konusudur. Bunun dışında, bazı out olmayan fraksiyonlarda bazik peptitler bulunmuştur.



Şekil 3.17: C10 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum ANQLDENRHFY peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.



Şekil 3.18: T12 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum AADALLK peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.

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

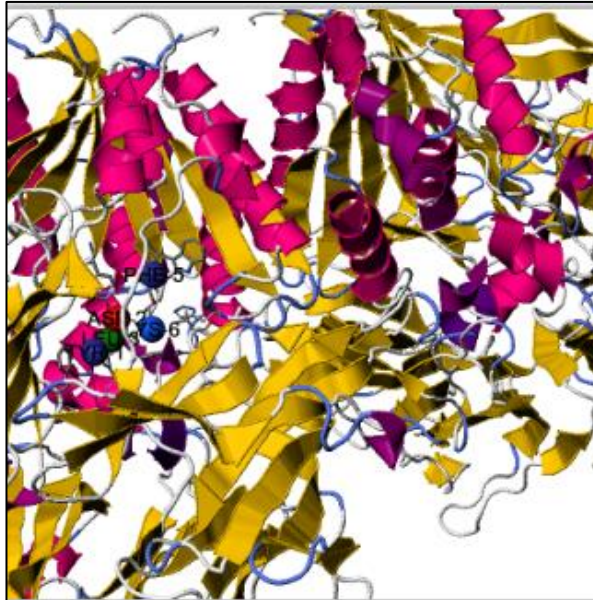
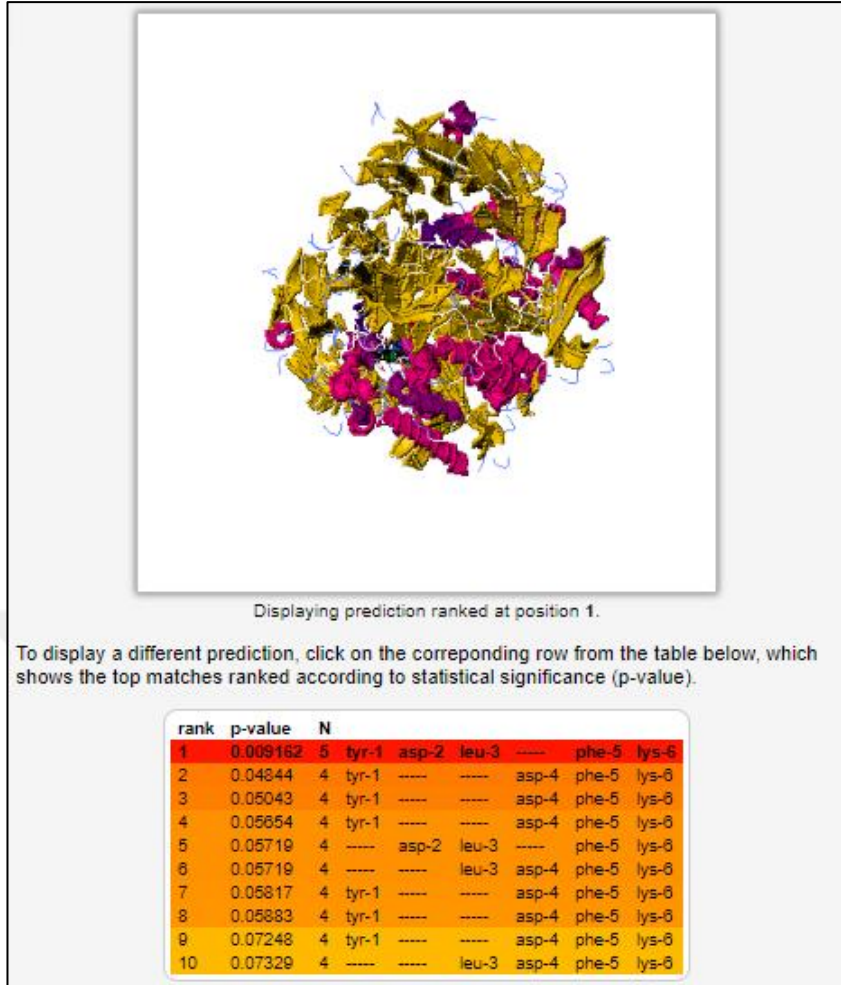
Hem *in vitro* DPP-IV aktivitesi bulgularanan, hem de bu aktiviteleri *in silico* tekniklerce doğrulanan peptitlerden; DPP-IV inhibisyon parametreleri bulunanlar arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan YDLDFK peptidi seçilmiş ve inhibisyon mekanizması incelenmiştir (Trabuco vd. 2012). Bu bağlamda aşağıdaki Şekil 3.19 ve Tablo 3.6’da söz konusu inhibitör peptidin analizi sunulmaktadır.

En muhtemel model, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç ortaya çıkarmaktadır. DPP-IV enziminin toplamda 766 amino asit uzunluğa sahip olması, modelin etkinliğini göstermek için önemlidir. Diğer modeller bu model kadar etkin değildir ve genellikle istatistiksel olarak geçerli bir bağlanma ya da etkileşim tanımlayamamaktadırlar. Dolayısıyla, muhtemel bağlanma Tablo 3.6’da sunulan detaylara uygun bir biçimde gerçekleşmektedir.

Tablo 3.6: YDLDFK peptidinin DPP-IV ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

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

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



Şekil 3.19: DPP-IV inhibisyon parametreleri bulunan DPP-IV inhibitörü peptitler arasında PeptideRanker değeri en yüksek olan YDLDFK peptidinin, DPP-IV ile etkileşiminin şematize edilmesi. Solda enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, sağdaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemiz için ekonomik öneme sahip Giresun tombul fıncığının yağı alındıktan sonra kalan posalarında yüksek oranda protein bulunmaktadır. Çalışmamızda bu proteinler alkali ekstraksiyonu-izoelektrik çöktürme yöntemiyle konsantre edilmiş ve 3 farklı enzimle (tripsin, kimotripsin, termolisin) hidroliz edilmiştir. Sonrasında hidrolizatlardan anyon değişim bazlı fraksiyonlar elde edilmiş ve bu fraksiyonlarda (ACE ve DPP-IV önleyici ve antioksidatif) aktivite testleri yapılmıştır. En yüksek aktivite değerleri 3 hidrolizatta da ACE testlerinde görülmüştür. Bunun yanı sıra DPP-4 ve antioksidan testlerinde çok sayıda fraksiyonda aktivite gözlenmiş ancak aktivite değerleri nispeten düşük bulunmuştur. Aktivite testlerinin ardından ACE inhibisyonu ve DPP-IV inhibisyonu aktivitesi gösteren fraksiyonlar LC-MS/MS analiz teknikleriyle incelenerek aktif fraksiyonlara ait peptit dizilimleri belirlenmiştir. Ancak bazı peptit moleküllerinin yapıları bu yolla belirlenememiştir. Bu durumun yeni proteinlerin varlığına ya da daha önce veri bankalarına işlenmemiş fındık proteinlerine işaret ettiği düşünülmektedir.

Çalışmada dizilimleri belirlenen peptitlerin, bazı fizikokimyasal ve biyoaktif özellikleri, literatürde bulunan *in silico* yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda, aktif fraksiyonlarının tamamına yakınında hem aktif hem de aktif olmayan peptitlerin bulunduğu anlaşılmıştır. Bu *in silico* yöntemlerle çalışmada 192 adet ACE aktif ve 14 adet DPP-IV aktif peptit belirlenmiştir. Bu peptitlerin hiçbirinde toksik etkilerin ortaya çıkması beklenmemektedir. Buna ek olarak, bazı alerjen proteinlerin de parçalandığı ve muhtemelen alerjik etkilerinin azalabileceği anlaşılmaktadır.

Araştırmada hem *in vitro* aktivitesi bulgularanan hem de bu aktiviteleri *in silico* tekniklerce doğrulanan peptitlerin inhibisyon mekanizması yine *in silico* teknikler kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca çalışmada DPP-IV inhibisyon parametreleri bulunan peptitler arasında PeptideRanker değerine göre en yüksek aktiviteye sahip olan YDLDFK peptidinin inhibisyon mekanizması incelenmiştir. Sonuçta YDLDFK triptik peptidinin DPP-IV üzerinde 10 muhtemel bağlanma noktasına sahip olduğu bulunmuştur. ACE aktif peptitleri arasından her bir enzim için en etkin olanının ACE ile etkileşim mekanizması incelenmiş ve bu inhibitörlerin ACE'nin hangi amino

asitleri ile etkileşebileceği belirlenmiştir. Buna göre Farklı enzimlerle muamele sonucu oluşan SPLAGR (tripsin), VPHW (kimotripsin) ve PGHF (termolisin) peptitleri, ACE üzerinde sırasıyla 16, 10 ve 11 muhtemel bağlanma noktasına sahip olduğu bulunmuştur.

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

KAYNAKÇA

- Acay, H. (2018). Yenilebilen yabani mantar *Morchella esculenta* (L.) Pers.'nın besinsel kalitesi ve biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesi. *Mantar Dergisi*, 9 (2), 95-105.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27 (6), 1256-1262.
- Agarwal, P., & Gupta, R. (2016). Alpha-amylase inhibition can treat diabetes mellitus. *Research and Reviews: Journal of Medical and Health Sciences*, 5, 1-8.
- Ahren, B. (2007). DPP-4 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21 (4), 517-533.
- Akev, N. (2019). Proteinlerin saflaştırılması ve Karakterizasyonu.2018-2019 Bahar Yarıyılı Farmasötik Biyoteknoloji Ders Notu s:14-22 URL: <https://aves.istanbul.edu.tr/ImageOfByte.aspx?Resim=8&SSNO=53&USER=590> Erişim:30.09.2019
- Altınışik, M. (1998). Amino asitler ve peptitler. 1998-1999 Eğitim-öğretim yılı tıp fakültesi 1.sınıf organik kimya ve biyokimya dersleri. S:1-18 URL:<https://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-06.pdf> Erişim:30.09.2019
- Aluko, R. E. (2015). Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. *Current Opinion in Food Science*, 4, 44-50.
- Anusha, R., & Bindhu, O. S. (2016). Bioactive Peptides from Milk, Milk Proteins- From Structure to Biological Properties and Health Aspects, Isabel Gigli, IntechOpen, DOI: 10.5772/62993. URL:<https://www.intechopen.com/books/milk-proteins-from-structure-to-biological-properties-and-health-aspects/bioactive-peptides-from-milk> Erişim:10.09.19

- Arcan, I., & Yemenicioğlu, A. (2007). Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chemistry*, 103 (2), 301-312.
- Arrutia, F., Puente, Á., Riera, F. A., Menéndez, C., & González, U. A. (2016). Influence of heat pre-treatment on BSA tryptic hydrolysis and peptide release. *Food Chemistry*, 202, 40-48.
- Aydemir, L. Y., Gökbulut, A. A., Baran, Y., & Yemenicioğlu, A. (2014). Bioactive, functional and edible film-forming properties of isolated hazelnut (*Corylus avellana* L.) meal proteins. *Food Hydrocolloids*, 36, 130-142.
- Barnett, A. (2006). DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes. *International Journal of Clinical Practice*, 60 (11), 1454-1470.
- Başaran, E., (2015). Fındıkta Uygulanan Ultrases Ön İşleminin Fındık Yağı Verimine ve Kalitesine Etkisi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Bayram, M. H., (2012). Antihipertansif İlaç Mekanizmaları. URL: <http://www.ivek.org.tr/calismalar/antihipertansif-ilac-mekanizmalari> Erişim tarihi:06.10.19
- Becker, E. M., Nissen, L. R., & Skibsted, L. H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219 (6), 561-571.
- Bilişli, A. (2009). *Gıda kimyası*. Sidas Yayıncılık, Çanakkale.s:100-120
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43 (2), 537-546
- Burrell, M. M. (Ed.). (1993). *Enzymes of Molecular Biology* (Vol. 16, pp. 263-270). Totowa, NJ: Humana Press.
- Ceran, D.G., (2018). Türkiye’de Üretilen Farklı Fındık Çeşitlerinin Fındık Zarı ve Fındık Küspesinin Bileşimi, Fenolik Madde Miktarı ve Antioksidan

Aktivitelerinin Belirlenmesi. Mersin Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Mersin.

- Chakrabarti, S., Jahandideh, F., & Wu, J. (2014). Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed Research International*, 2014.
- Chen, G. T., Zhao, L., Zhao, L. Y., Cong, T., & Bao, S. F. (2007). *In vitro* study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (2), 357-362.
- Chen, H. M., Muramoto, K., & Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean. beta.-Conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (3), 574-578.
- Çiftçi, H.S., (2018). Fındık ve Susam Posalarından Üretilen Protein Konsantrelerinin Gıda Ürünlerinde Değerlendirilmesi. Namık Kemal Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ.
- Dinis, T. C., Madeira, V. M., & Almeida, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315 (1), 161-169.
- Erdmann, K., Cheung, B. W., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19 (10), 643-654.
- FitzGerald, R. J., & Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84 (S1), 33-37
- Garcia, J. M., Agar, I. T., & Streif, J. (1994). Lipid characteristics of kernels from different hazelnut varieties. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 18, 199-202.
- GE Healthcare, (2010). Strategies for protein purification handbook (28-9833-31 AA), İsveç
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., Raghava, G. P., & Open Source Drug Discovery Consortium. (2013). *In Silico* Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLoS One*, 8 (9), e73957.

- Gülseren, I., & Corredig, M. (2013). Storage stability and physical characteristics of tea-polyphenol-bearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (13), 3242-3251.
- Gülseren, İ. (2018). *In silico* methods to identify ACE and DPP-IV inhibitory activities of ribosomal hazelnut proteins. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12 (4), 2607-2614.
- Gülseren, İ., Çakır, B., & Çağlar, A. F. (2019). Preliminary investigations *in vitro* ACE-inhibitory activities of tryptic peptides produced from cold press deoiled hazelnut meals. *GIDA/The Journal of FOOD*, 44 (2) 309-317.
- Haddad, P.R., Jackson, P.E., (1990). Ion Chromatography: principles and applications. In: *Journal of Chromatography Library*-Volume 46, Elsevier, pp. 1-28, Amsterdam
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., & Aruoma, O. I. (1987). The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, 165 (1), 215-219.
- Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4 (1), 6-24.
- Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (2), 163-169.
- Holst, J. J., & Gromada, J. (2004). Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 287 (2), E199-E206.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., & Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs. *Peptides*, 29 (6), 1062-1071.
- Kedziora-Kornatowska, K. Z., Luciak, M., & Paszkowski, J. (2000). Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the diabetic kidney: effect of treatment with angiotensin convertase inhibitors. *IUBMB Life*, 49 (4), 303-307.

- Keil, B. (1971). 8 Trypsin. In *The enzymes* (Vol. 3, pp. 249-275). Academic Press.
- Kenney, A.C., 1992. Ion-Exchange Chromatography of Proteins. In: *Methods in Molecular Biology*, A. Kenney and S. Fowell (Editors), Humana Press, pp. 249-258, New Jersey.
- Konak, Ü. İ., Turhan, İ., & Certel, M. (2014). Proteinlerin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 12 (2), 79-87.
- Köksal A.İ.; Artik N.; Şimşek A.; Güneş N. (2006), Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey, *Food Chemistry*, 99, (3), 509-515.
- Lacroix, I. M., & Li-Chan, E. C. (2012a). Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an *in silico* approach. *Journal of Functional Foods*, 4 (2), 403-422.
- Lacroix, I. M., & Li-Chan, E. C. (2012b). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 25 (2), 97-102.
- Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. D. C., Braga, A. R. C., Egea, M. B., & Fernandes, K. F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (6), 950.
- Li-Chan, E. C., Hunag, S. L., Jao, C. L., Ho, K. P., & Hsu, K. C. (2012). Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (4), 973-978.
- Li, Y., & Yu, J. (2015). Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides. *Journal of Medicinal Food*, 18 (2), 147-156.
- Liu, C., Fang, L., Min, W., Liu, J., & Li, H. (2018a). Exploration of the molecular interactions between angiotensin-I-converting enzyme (ACE) and the inhibitory peptides derived from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.). *Food Chemistry*, 245, 471-480.
- Liu, C., Ren, D., Li, J., Fang, L., Wang, J., Liu, J., & Min, W. (2018b). Cytoprotective effect and purification of novel antioxidant peptides from hazelnut (*C. heterophylla* Fisch) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 42, 203-215.

- Matthews, B. W., Sigler, P. B., Henderson, R., & Blow, D. M. (1967). Three-dimensional structure of tosyl- α -chymotrypsin. *Nature*, 214(5089), 652-656.
- Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47 (3), 469-474.
- Mazorra-Manzano, M. A., Ramírez-Suarez, J. C., & Yada, R. Y. (2018). Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (13), 2147-2163.
- Meisel, H. (1993). Casokinins as inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *New Perspectives in Infant Nutrition*, 153-159.
- Memişoğulları, R. (2006). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., & Darewicz, M. (2008). BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *Journal of AOAC International*, 91 (4), 965-980.
- Mooney, C., Haslam, N. J., Pollastri, G., & Shields, D. C. (2012). Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity. *PLoS ONE*, 7 (10), e45012.
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47 (4), 171-182.
- Murray, B. A., & FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13 (8), 773-791.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., & Takano, T. (1995). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78 (4), 777-783.
- Nauck, M., Frid, A., Hermansen, K., Shah, N. S., Tankova, T., Mitha, I. H., ... & Matthews, D. R. (2009). Efficacy and safety comparison of liraglutide, glimepiride, and placebo, all in combination with metformin, in type 2

- diabetes: the LEAD (liraglutide effect and action in diabetes)-2 study. *Diabetes Care*, 32 (1), 84-90.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66 (5), 642-646.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2013). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. *Peptides*, 39, 157-163.
- Nongonierma, A. B., Paoletta, S., Mudgil, P., Maqsood, S., & FitzGerald, R. J. (2018). Identification of novel dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides in camel milk protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 244, 340-348.
- Ohata, M., Uchida, S., Zhou, L., & Arihara, K. (2016). Antioxidant activity of fermented meat sauce and isolation of an associated antioxidant peptide. *Food Chemistry*, 194, 1034-1039.
- Onat, A., Can, G., Çiçek, G., Ayhan, E., Doğan, Y., & Kaya, H. (2013). Fasting, non-fasting glucose and HDL dysfunction in risk of pre-diabetes, diabetes, and coronary disease in non-diabetic adults. *Acta Diabetologica*, 50 (4), 519-528.
- Ondetti, M. A., & Cushman, D. W. (1982). Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*, 51 (1), 283-308.
- Oktay, M., Gülçin, İ., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003). Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 36 (2), 263-271.
- Özdemir, F., & Akinci, I. (2004). Physical and nutritional properties of four major commercial Turkish hazelnut varieties. *Journal of Food Engineering*, 63 (3), 341-347.
- Özdemir, M. (1997). Critical evaluation of properties of Turkish hazelnuts. *Gıda Teknolojisi*, 10, 1-9.
- Patil, P., Mandal, S., Tomar, S. K., & Anand, S. (2015). Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. *European Journal of Nutrition*, 54 (6), 863-880.

- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., & KORHONEN, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67 (1), 53-64.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Pohl, C. A., Stillian, J. R., & Jackson, P. E. (1997). Factors controlling ion-exchange selectivity in suppressed ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 789 (1-2), 29-41.
- Polychroniadou, A. (1988). A simple procedure using trinitrobenzenesulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese. *Journal of Dairy Research*, 55 (4), 585-596.
- Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (1995). Evolutionary families of metallopeptidases. In *Methods in Enzymology* pp. 183-228, Academic Press.
- Ruiz, J. Á. G., Ramos, M., & Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 14 (12), 1075-1080.
- Sağlam, M., Boşnak-Güçlü, M., İnce, D. İ., Savcı, S., Arıkan, H., & Tedavi, F. (2008). Hipertansiyon ve egzersiz. *Baskı, Ankara, Klasmat Matbaacılık*, 9, 91-96.
- Savran, H.E. (2014). Fındığın Tarihçesi., URL:<https://arastirma.tarimorman.gov.tr/findik> Erişim:10.10.19
- Scopes, R.K., 2000. Protein Separation. In: Encyclopedia of Separation Science, M. Cooke and C.F. Poole (Editors), Academic Press, pp. 405-410, USA.
- Sebokova, E., Christ, A. D., Boehringer, M., & Mizrahi, J. (2007). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: the next generation of new promising therapies for the management of type 2 diabetes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7 (6), 547-555.

- Sheehan, D., Fitzgerald, R., 2008. Ion-Exchange Chromatography. In: Molecular Biomethods Handbook, R. Rapley and J.M. Walker (Editors), Humana Press, pp. 445-449, New Jersey.
- Sheih, I. C., Fang, T. J., & Wu, T. K. (2009). Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chemistry*, 115 (1), 279-284.
- Singh, B. P., Vij, S., & Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171-179.
- Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., & Kaul, P. (2007). Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry*, 101 (4), 1484-1491.
- Sobutay, T. (2006). Fındık Sektör Araştırması. İstanbul Dış Ticaret Odası Dış Ticaret Şubesi Uygulama Şubesi, İstanbul, 20s. URL:<https://www.yumpu.com/tr/document/read/23254946/fndk-sektor-arastirmas-ito> Erişim:10.10.2019
- Tatar, F., Tunç, M. T., Kahyaoglu, T., (2013). Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.) protein concentrates: functional and rheological properties. *Journal of food science and technology*, 52 (2), 1024-1031.
- TİM, (2018). Türkiye İhracatçılar Merkezi., URL:<https://www.tim.org.tr/tr/ihracat-rakamlari.html> Erişim:08.10.2018
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., & Vioque, J. (2012). Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. *Food Chemistry*, 134 (3), 1585-1588.
- Trabuco, L. G., Lise, S., Petsalaki, E., & Russell, R. B. (2012). PepSite: prediction of peptide-binding sites from protein surfaces. *Nucleic Acids Research*, 40 (W1), W423-W427.
- Tüfekçi, F. (2018). Karadeniz Bölgesinde Yetiştirilen Fındıkların Yağ Asitleri Kompozisyonunun Araştırılması. İstanbul Aydın Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul.
- TÜİK, (2019). Türkiye İstatistik Kurumu, Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2019. URL:<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=30626> Erişim:22.09.2019

- Türkiye Diyabet Programı 2015-2020, Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara. 2014:47–49. URL:<https://www.diyabetimben.com/turkiye-diyabet-programi-2015-2020/> Erişim:22.09.2019
- Ünal, M. Ü., Şener, A., & Cemek, K. (2018). BİYOAKTİF PEPTİTLERİN SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ. *GIDA*, 43 (6), 930-942.
- Ünlüsayın, M., Erdilal, R., & Çagatay, T. (2009). BALIK PROTEİNLERİNİN SAFLASTIRILMASINDA KULLANILAN SON YÖNTEMLER/The recent methods on using for purification of fish proteins. *Journal of FisheriesSciences. com*, 3 (4), 298.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., & Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92 (3), 357-366.
- Vincent, A. M., Russell, J. W., Low, P., & Feldman, E. L. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews*, 25 (4), 612-628.
- Walsh, K. A. (1970). [4] Trypsinogens and trypsins of various species. In *Methods in Enzymology* (Vol. 19, pp. 41-63). Academic Press.
- Whitford, D., (2005). Protein expression, purification and characterization. In: *Proteins: Structure and Function*, John Wiley & Sons, pp. 313-346, England.
- Yaron, A., Naider, F., & Scharpe, S. (1993). Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28 (1), 31-81.
- Yu, J., Ahmedna, M., Goktepe, I., Cheng, H., & Maleki, S. (2011). Enzymatic treatment of peanut kernels to reduce allergen levels. *Food Chemistry*, 127 (3), 1014-1022.

EKLER

EK-1

LC-MS/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda triptik ACE aktif fındık peptitlerin, belirlenen fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4.1: Triptik ACE aktif fındık peptitlerin, fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri.

T2	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	Fraksiyon
QDPAHQPR	ALPDDVLANAFQISR	WER	SPLAGR	Sekanslar	
931,4356	1629,861	490,2403	600,3462	M.A. (g/mol)	
Oleosin [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana] & Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak protein	
Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite	
0,518132	0,521469	0,566856	0,615224	PeptideRanker	
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivite (BIOPEP)	
0.2500	0.2667	0.3333	0.6667	Parametre A (BioPep)	
0.030487804 878049	0.0021436230544149		0.00115047 50841229	Parametre B (BioPep)	
7,10	4,21	6,36	10,1	pI	

T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T2	Fraksiyon
NSNTLPVLR	RAESEGFVWVAFK	LPVLR	SNTLPVLR	AHQPR	QGQQQFGQR	HQPR		Sekanslar
996,5493	1555,746	597,4082	899,5326	608,3255	1076,52	537,2885		M.A. (g/mol)
Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana] & Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Oleoin [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana] & Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Oleoin [Corylus avellana]		Kaynak protein
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok		Toksiste
0,368002	0,368157	0,405471	0,417433	0,420359	0,422902	0,442155		PeptideRanker
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü		Aktivite (BIOPEP)
0.1111	0.4615	0.2000	0.1250	0.4000	0.4444	0.2500		Parametre A (BioPep)
0.0007032348 8045007	0.0028505641091824	0.00126582 27848101	0.000791139 24050633	0.04878048 7804878	7,68E+08	0.060975 60975609		Parametre B (BioPep)
10,1	4,79	10,1	10,1	10,11	10,1	10,11		pI

T3	T3	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T2	Fraksiyon
QLQDPAHQPR	QLQDPAHQPR	SRQEWER	SRADIY	PVLR	LQDPAHQPR		Sekanslar
1189,606	1189,606	990,4738	706,3521	484,3237	1061,546		M.A. (g/mol)
Oleoin [Corylus avellana]	Oleoin [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana] & Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Oleoin [Corylus avellana]		Kaynak protein
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok		Toksosite
0,3272	0,3272	0,329473	0,33775	0,343353	0,362099		PeptideRanker
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü		Aktivite (BIOPEP)
0.3000	0.3000	0.1429	0.3333	0.2500	0.3333		Parametre A (BioPep)
0.024390243902439	0.024390243902439		0.079727398205659	0.0015822784810127	0.02710027100271		Parametre B (BioPep)
7,1	7,1	6,5	6,19	10,1	7,10		pI

T1 (out)	T3	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T2	Fraksiyon
GDLQR	AREMKDR	TLPVLR	LQMVR	NTPVLR	WLQSAER	QLQDPAHQPR	Sekanslar		
588,3084	905,4735	698,4552	628,3615	812,4998	1002,535	1189,606	M.A. (g/mol)		
11S globulin-like protein [Corylus avellana] & Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Oleosin [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	Oleosin [Corylus avellana]	Kaynak protein		
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite		
0,264071	0,26811	0,276853	0,297895	0,299429	0,301452	0,327196	PeptideRanker		
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivite (BIOPEP)		
0.4000	0.1429	0.1667	0.4000	0.1429	0.2500	0.3000	Parametre A (BioPep)		
2.1739130434783 E-5	0.00149588 63126402	0.00105485 23206751	0.00378787 87878788	0.00090415 913200723	0.003019323 6714976	0.024390243902 439	Parametre B (BioPep)		
6,19	9,1	10,1	10,1	10,1	6,36	7,10	pI		

T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	Fraksiyon
EWER	QEWER	SRADI	LNALPTNR	ADITYTEQVGR	RPER	SRQWE	Sekanslar			
619,2834	747,3417	543,2891	1028,5372	1151,568	557,3145	816,3647	M.A. (g/mol)			
Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana] & Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana] & Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak protein			
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksiste			
0,212548	0,216446	0,217364	0,222038	0,222525	0,246787	0,25081	PeptideRanker			
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivite (BIOPEP)			
0.2500	0.2000	0.2000	0.3333	0.4000	0.2500	0.1667	Parametre A (BioPep)			
		0.00043478 260869565	1.7580872011252 E-5	0.04774120670 9957	0.00138888 88888889		Parametre B (BioPep)			
4,54	4,54	6,19	6,36	4,38	9,95	4,54	pI			

T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	Fraksiyon
LMENIGSR	TNDNAQISPLAGR	SRADIYTE	LRENICTR	ENICTR	PER	LQMVRPER	Sekanslar			
919,4659	1357,6691	936,4419	1061,55	792,3569	401,214	1028,5775	M.A. (g/mol)			
Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana] & Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak protein			
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite			
0,182573	0,184665	0,191048	0,193975	0,206686	0,208537	0,208937	PeptideRanker			
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	dipeptidyl peptidase III inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivite (BIOPEP)			
0.3750	0.3077	0.3750	0.1250	0.1667	0.3333	0.5000	Parametre A (BioPep)			
0.00013706 140350877	0.000530988500364 43	0.059795548 654244	0.000791139 24050633			0.059880050 50505	Parametre B (BioPep)			
6,36	6,19	4,38	8,6	6,32	6,36	9,95	pI			

T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	Fraksiyon
LVR	TVNSNTLPVLR	INTVNSNTLPVLR	LQMRPE	SRADYTEQVGR	EGR	Sekanslar		
387,2715	1196,6646	1441,802	854,4566	1394,701	361,1821	M.A. (g/mol)		
11S globulin-like protein [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana] & Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana] & Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak protein		
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite		
0,147298	0,155289	0,163209	0,163236	0,167738	0,181001	PeptideRanker		
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivite (BIOPEP)		
0.6667	0.0909	0.0769	0.5714	0.4167	0.6667	Parametre A (BioPep)		
0.03012265	0.0005753739930	0.000486854917234	0.068434343	0.039965498345254	0.0001375	Parametre B (BioPep)		
5122655	9551	66	434343					
10,1	10,1	10,1	6,36	6,42	6,36	pI		

T3	T1 (out)	T3	T1 (out)	T3	T1 (out)	Fraksiyon
DRAEQFGQQHVTGSQGS	LQVVRPER	AEQFGQQHVTGSQGS	LQVVRPER	AEQFGQQHVTGSQGS	TSAIR	Sekanslar
1831,828	996,5926	1560,704	996,5926	1560,704	547,3178	M.A. (g/mol)
Oleosin [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	Oleosin [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	Oleosin [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana] & Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak protein
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksisite
0,10358	0,112926	0,124	0,112926	0,124	0,135102	PeptideRanker
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivite (BIOPEP)
0.4118	0.6250	0.4000	0.6250	0.4000	0.4000	Parametre A (BioPep)
0.00019702949895439	0.061423260381594	7.8372562583089E-5	0.061423260381594	7.8372562583089E-5	0.058938796177135	Parametre B (BioPep)
5,33	9,95	5,25	9,95	5,25	10,1	pI

T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T3	Fraksiyon
NRQETTLAR	NRQETTLVR	QETTLAR	SRQE	VEGR	DRAEQFGQHQHVTGSQGS	Sekanslar		
1088,58	1116,609	818,4321	501,2411	460,2499	1831,828	M.A. (g/mol)		
Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana] & Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Oleosin [Corylus avellana]	Kaynak protein		
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite		
0,077906	0,079563	0,081584	0,083456	0,085562	0,10358	PeptideRanker		
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivite (BIOPEP)		
0,2222	0,2222	0,2857	0,2500	0,7500	0,4118	Parametre A (BioPep)		
0,0015218900 711216	0,0100408850 40885	0,00195671 58057278		0,000103125	0,00019702949895439	Parametre B (BioPep)		
9,95	9,95	6,36	6,36	6,36	5,33	pI		

T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	Fraksiyon
YNRQETTLVR	NIVKVEGR	QETTLVR	YNRQETTLAR	TTLAR	RQETTLVR	YTEQVGR	Sekanslar		
1279,673	915,5247	846,4627	1251,6375	561,3346	1002,571	852,4217	M.A. (g/mol)		
11S globulin-like protein [Corylus avellana] & Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak protein		
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite		
0,069442	0,069969	0,071209	0,072732	0,07643	0,076842	0,07709	PeptideRanker		
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivite (BIOPEP)		
0.3000	0.5000	0.2857	0.3000	0.4000	0.2500	0.4286	Parametre A (BioPep)		
0.010997580850522	0.0096669471153846	0.012909709338281	0.0033304853777349	0.0027394021280189	0.011295995670996	0.00017451298701299	Parametre B (BioPep)		
9,1	9,1	6,36	9,1	10,1	9,95	6,35	pI		

T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	T1 (out)	Fraksiyon
INTVNS	ETTLVR	VKVEGR	TTLVR	ETTLAR	NIVKV	TEQVGR	Sekanslar			
629,3241	718,4095	687,4154	589,367	690,3784	554,3665	689,3572	M.A. (g/mol)			
Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak protein			
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite			
0,043416	0,046508	0,049188	0,052496	0,057653	0,057979	0,059363	PeptideRanker			
dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivite (BIOPEP)			
0.6667	0.3333	0.6667	0.4000	0.3333	0.2000	0.5000	Parametre A (BioPep)			
	0.015061327561328	0.012889262820513	0.018073593073593	0.0022828351066824	0.015384615384615	0.00020359848484848	Parametre B (BioPep)			
5,88	6,36	9,1	10,1	6,36	9,11	6,36	pI			

EK-2

LC-MS/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda kimotriptik ACE aktif fındık peptitlerin, belirlenen fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4.2: Kimotriptik ACE aktif fındık peptitlerin, fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri.

Fraksiyon	Sekanslar	M.A. (g/mol)	Kaynak proteini	pI	Toksosite	PeptideRanker	Parametre A (BioPep)	Parametre B (BioPep)
C2 & C3	VPHW	538,2772	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	7,37	Yok	0.79343	0.5000	0.000595238095 2381
C2 & C3	SGFDAEF	772,3148	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	3,29	Yok	0.753034	0.4286	0.0002811580772659 9
C2 & C3	LADAF	536,2715	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	3,37	Yok	0.593563	0.6000	0.0017504244482173
C2 & C3	ANQLDENPRHF	1340,634	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	5,11	Yok	0.449987	0.0909	0.022172949002217

C2 & C3	C2 & C3	C3	C2 & C3	C2 & C3	Fraksiyon
NLNAHSVY	AVAKRAESEG	AVAKRAESEGF	SNAPELIY	VPHW	Sekanslar
1016,516	1164,601	1479,7227	906,4567	538,2772	M.A. (g/mol)
11S globulin-like protein [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	11S globulin-like protein [Corylus avellana]	Kaynak proteini
7,36	6,74	4.72	3,64	7,37	pI
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksisite
0.103206	0.177897	0.260464	0.323365	0.79343	PeptideRanker
0.3333	0.4545	0.4615	0.3750	0.5000	Parametre A (BioPep)
0.015649452269171	0.00068531930957	0.00057988556963616	0.21631728778468	0.0005952380952381	Parametre B (BioPep)

EK-3

LC-MS/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda termolisın muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin, belirlenen fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4.3: Termolisın muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin, fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri.

Fraksiyon	Sekanslar	M.A. (g/mol)	Kaynak proteini	Toksosite	PeptideRanker	Aktivitesi (BIOPEP)	Parametre A (BioPep)	Parametre B (BioPep)	pI
E out	PHWNL	666,3347	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Yok	0,881578	ACE inhibitörü	0.2000		7,1
E out	SAPGHF	615,2885	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Yok	0,888106	ACE inhibitörü	0.6667	0.00095470 521008843	7,1
E out	APGHF	528,2565	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Yok	0,926286	ACE inhibitörü	0.8000	0.00114564 62521061	7,1
E out	PGHF	457,2194	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Yok	0,950238	ACE inhibitörü	0.7500	0.00034510 129339351	7,1

E out	E out	E out	E5	E out	E out	E out	E out	E out	Fraksiyon
PGCPETF	HGNSRFPL	PKEDPELKCKK HKCRDERQF	PQNF	PQNF	PQNF	EDPQQSQGGGQGGQ SQRSEQDRHQKIRYF	Sekanslar		
807,3321	927,4795	2629,297	505,2398	505,2409	3601,7292	M.A. (g/mol)			
Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak proteini			
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite			
0,748648	0,756275	0,824722	0,828725	0,828725	0,855965	PeptideRanker			
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivitesi (BIOPEP)			
0.2857	0.5000	0.1000	0.5000	0.5000	0.3333	Parametre A (BioPep)			
0.00794491 12978525	0.00213132 06948126		0.00539956 80345572	0.00539956 80345572	0.0032880288165253	Parametre B (BioPep)			
4	10,11	8,87	5,88	5,88	7,11	pI			

E out	E out	E out	E out	E out	E out	E out	E out	E out	E5	Fraksiyon
DENPRHF	DENPRHFYL	FPGPNKQQEEG GRGGRA	PGPNKQQEEGG RGGRAF	YVPHWNL	NPHTF	PGCPETF				Sekanslar
914,4105	1190,5564	1784,879	1785,863	929,454	615,2885	807,3321				M.A. (g/mol)
Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotei n precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]				Kaynak proteini
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok				Toksiste
0,604511	0,612056	0,642436	0,692956	0,717782	0,725044	0,748648				PeptideRanker
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü				Aktivitesi (BIOPEP)
0.1429	0.2222	0.6471	0.6471	0.5714	0.4000	0.2857				Parametre A (BioPep)
0.034843205 574913	0.0315447154 47154	0.00073155157840 648	0.00085440773841 434	0.001302696 2609861	0.01111111 11111111	0.00794491 12978525				Parametre B (BioPep)
5,33	5,33	9,1	9,1	7,09	7,1	4				pI

E out	E out	E out	E out	E out	E out	E out	Fraksiyon
NAHGNSRF	PGPNKQQEEGG RGGRA	GQRRRQQQHSRGKE GEQEQGEGNNVF	EPNGLL	GQRRRQQQHSRGKE GEQEQGEGNNV	AGPYYSRA	Sekanslar	
902,4227	1638,794	3168,4934	642,342	3020,448	998,469	M.A. (g/mol)	
48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Kaynak proteini	
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite	
0,522982	0,556706	0,556848	0,561954	0,565899	0,596564	PeptideRanker	
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivitesi (BIOPEP)	
0,4737	0,6250	0,4815	0,3333	0,4615	0,5556	Parametre A (BioPep)	
0,016929433 509826	0,0005788608536 4419	0,0043722357634575	8,05555555 55556E-5	0,00035979667074763	0,003102058261 686	Parametre B (BioPep)	
10,11	9,1	9,1	4	9,1	8,93	pI	

E out	E5	E out	E out	E3	E out	E out	Fraksiyon
GPNKQQEEGGRGG RA	TIPQNF	TIPQNF	RERQQEEGNSSEE SYGKEQEENPYV	EANPHTF	EANPHTF	EANPHTF	Sekanslar
1523,731	719,37	719,3708	3001,304	815,3682	815,3682	815,3682	M.A. (g/mol)
48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Kaynak proteini
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksisite
0,471101	0,47524	0,47524	0,499197	0,508863	0,508863	0,508863	PeptideRanker
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivitesi (BIOPEP)
0.6000	0.5000	0.5000	0.2400	0.4286	0.4286	0.4286	Parametre A (BioPep)
0.0006135300085930 2	0.0048817 63305089	0.00488176 33050894	0.000710506468347 39	0.00795079 36507937	0.00795079 36507937	0.00795079365 07937	Parametre B (BioPep)
9,1	5,88	5,88	4,27	5,25	5,25	5,25	pI

E out	E3	E out	E out	E out	E out	E out	Fraksiyon
PQYSNAPEL	PGHFEA	PGHFEA	VRPERSRQEWERQERE SEQERERQRRQGGGRD V	GTPVYM	GPYYNSRA	Sekanslar	
1018,488	657,2999	657,2991	4764,3657	667,312	927,4319	M.A. (g/mol)	
Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprote in precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Kaynak proteini	
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite	
0,451668	0,459167	0,459167	0,459736	0,459992	0,470918	PeptideRanker	
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivitesi (BIOPEP)	
0.2222	0.6667	0.6667	0.2703	0.5000	0.3750	Parametre A (BioPep)	
0.0004830917 8743961	0.00024673 419559568	0.00024673 419559568	0.013095045338758	0.0240813 19233176	0.003217514 2817256	Parametre B (BioPep)	
4	5,25	5,25	10,96	5,88	8,93	pI	

E out	E3	E out	E out	E out	E out	E5	Fraksiyon
SQHEEGPPRI	GGESSGPINL	GGESSGPINL	GGESSGPINL	KKCKHKCRDERQF	ESWDHNDQQF	PQYSNAPEL	Sekanslar
1149,565	930,4535	930,4527	930,4527	1820,901	1305,5006	1018,491	M.A. (g/mol)
48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak proteini
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksisite
0,394326	0,40906	0,40906	0,40906	0,433813	0,451025	0,451668	PeptideRanker
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivitesi (BIOPEP)
0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.0769	0.7000	0.2222	Parametre A (BioPep)
0.02912508403875	0.0017266780183838	0.0017266780183838	0.0017266780183838			0.00048309178743961	Parametre B (BioPep)
5,41	4	4	4	9,71	4,03	4	pI

E3	E out	E out	E out	E out	E out	E out	E3	Fraksiyon
LSQHEEGPPRI	LSQHEEGPPRI	RRQQRHFGEENL	KNQDQAF	HPDDHKQL	SQHEEGPPRI			Sekanslar
1262,644	1262,649	1728,8394	850,4054	989,4799	1149,562			M.A. (g/mol)
48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]			Kaynak proteini
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok			Toksisite
0,31663	0,31663	0,320013	0,320964	0,353612	0,394326			PeptideRanker
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü			Aktivitesi (BIOPEP)
0.4545	0.4545	0.2308	0.1429	0.2500	0.5000			Parametre A (BioPep)
0.026477349126137	0.026477349126137	0.00032302858397954	0.00075187969924812		0.02912508403875			Parametre B (BioPep)
5,41	5,41	10,29	6,19	6	5,41			pI

E out	E out	E out	E5	E out	E out	E out	Fraksiyon
NRDENEKLF	YGAGGEDPESF	SSSSGSYQKI	ESEGFQWV	PAGTPV	GLRRQQQRHF		Sekanslar
1164,565	1128,448	1043,5	982,4074	1325,7339	541,298		M.A. (g/mol)
48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]		Kaynak proteini
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok		Toksosite
0,277626	0,282698	0,290918	0,29204	0,295505	0,310387		PeptideRanker
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü		Aktivitesi (BIOPEP)
0.0025317386 931104	0.5455	0.4000	0.3750	0.3000	0.5000		Parametre A (BioPep)
0.3333	0.0008691967676 0505	0.0016593704 715812	0.000210912 6984127	0.001047303006 0329	0.00067380 749608649		Parametre B (BioPep)
4,68	3,58	8,94	3,68	12,31	5,88		pI

E5	E out	E out	E out	E out	E out	E out	E out	E out	Fraksiyon
QSNQDKRRNIV	NSNTLPV	QREGL	EGRLQM	QSNQDKRRNI	YEHPDDHKQL	HKHPQSNQF	Sekanslar		
1360,683	745,3739	602,3254	733,3662	1258,6493	1352,623	1210,56	M.A. (g/mol)		
Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Kaynak proteini		
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite		
0,233001	0,236476	0,248604	0,250125	0,255261	0,262578	0,267123	PeptideRanker		
ACE inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivitesi (BIOPEP)		
0.1818	0.5714	0.4000	0.6667	0.2000	0.4545	0.2000	Parametre A (BioPep)		
0.00057959046214972	6.0277275467149E-5	0.0001	0.0001370840166735	0.0006375495083647	0.00015318520439776		Parametre B (BioPep)		
10,84	5,88	6,36	6,36	10,84	5,22	9,11	pI		

E5	E out	E out	E out	E out	E5	E out	E out	E out	E out	Fraksiyon
LPQYSNA	AGKGNİ	RSSRSSSERM	SQNNNLQV	GKGNİ	AGNPDDDEHQ RQGQQQF	RQGQVL	Sekanslar			
792,382	559,3198	1182,5679	916,4483	488,2827	1854,811	700,4093	M.A. (g/mol)			
Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak proteini			
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite			
0,204264	0,213641	0,215151	0,22323	0,22343	0,229241	0,229597	PeptideRanker			
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivitesi (BIOPEP)			
0.1429	0.5000	0.1000	0.1250	0.4000	0.1875	0.3333	Parametre A (BioPep)			
	0.000149614 19753086			9.9537037 037037E-5	4.23745173745 17E-5	4.63320463 32046E-5	Parametre B (BioPep)			
5,88	9,11	11,7	5,88	9,11	4,54	10,11	pI			

E out	E out	E5	E5	E out	E out	E out	E out	E out	E out	Fraksiyon
FKNQDQA	RYFQEGDI	PDDV	QEGDII	PTNRI	SSSSGSYQKISA	FGESKQSI	NSNTL	Sekanslar		
850,4054	1027,4976	445,1921	674,3333	583,3214	1201,57	952,4734	530,2575	M.A. (g/mol)		
48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak proteini		
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite		
0,152301	0,171712	0,179103	0,185047	0,192498	0,194857	0,197311	0,200658	PeptideRanker		
dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	ACE inhibitörü	-	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	Aktivitesi (BIOPEP)		
0,5714	0,5000	-	0,3333	0,2000	0,3333	0,4444	0,4000	Parametre A (BioPep)		
	0,01436797 1107336	-	3,47826086 95652E-5		0,0013828087263 177	0,000114568 15002137		Parametre B (BioPep)		
6,19	4,38	3,57	3,67	10,11	8,94	6,35	5,88	pI		

E out	E out	E5	E out	E out	E out	E out	E out	E out	E out	E3	Fraksiyon
INRDENEKL	GRTSAI	DDNGNTV	KGRATI	PSREVERI	EPTNRI	LEPTNRI	FKNQDQA	Sekanslar			
1130,58	604,3492	735,2798	645,4042	985,5425	729,3881	843,4566	850,4041	M.A. (g/mol)			
48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Kaynak proteini			
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksiste			
0,132881	0,136184	0,137352	0,142015	0,144873	0,147011	0,149584	0,152301	PeptideRanker			
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	Aktivitesi (BIOPEP)			
0.2222	0.3333	0.1429	0.5000	0.2500	0.1667	0.1429	0.5714	Parametre A (BioPep)			
0.0022133687 472333	0.04892793 8660802	1.19047619 04762E-5	0.00046648 550724638					Parametre B (BioPep)			
4,68	10,11	3,57	11,01	6,5	6,36	6,36	6,19	pI			

E out	E out	E out	E out	E2	E5	E3	Fraksiyon
GRTSA	NGFEETI	AGRTSA	NRDENEKL	GDRQTGKTA	EHQRQGGQQF	INRDENEKL	Sekanslar
491,2539	809,3641	562,2938	1017,496	933,4752	1285,606	1130,573	M.A. (g/mol)
Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	ATP synthase CF1 alpha subunit (chloroplast) [Corylus]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Kaynak proteini
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksisite
0,121634	0,121836	0,122128	0,126663	0,130842	0,131515	0,132881	PeptideRanker
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivitesi (BIOPEP)
0.2000	0.2857	0.3333	0.2500	0.3333	0.2000	0.2222	Parametre A (BioPep)
6.25E-5	0.000238662 13151927	0.000118 75	0.002490039 8406375	4.38767709299 11E-5	2.779922779922 8E-5	0.0022133687 472333	Parametre B (BioPep)
10,11	3,8	10,11	4,68	9,1	7,1	4,68	pI

E5	E out	E out	E out	E5	E out	E out	E out	E out	E out	Fraksiyon
LRQQV	DEQRRDGKQ ICEEKA	TNRI	GEQSKGSI	RQGQV	RQGQV	RQGQV	RQGQV	RQGQV	FKTNDNA	Sekanslar
700,41	1989,941	503,2928	805,405	587,3265	587,3257	587,3257	587,3257	809,3789	M.A. (g/mol)	
Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak proteini
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksisite
0,103699	0,109566	0,111999	0,112701	0,118199	0,118199	0,118199	0,118199	0,118729		PeptideRanker
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü		Aktivitesi (BIOPEP)
0.5000	0.3125	0.7500	0.3750	0.4000	0.4000	0.4000	0.4000	0.7143		Parametre A (BioPep)
0.00110118 43670072	0.0073109966297 266		9.51053849 90253E-5	5.55984555 98456E-5	5.55984555 98456E-5	5.55984555 98456E-5	5.55984555 98456E-5			Parametre B (BioPep)
10,11	4,95	10,11	6,35	10,11	10,11	10,11	10,11	6,19		pI

E out	E out	E5	E out	E out	E out	E out	Fraksiyon
GRVQV	DDELRQGQV	DDELRQGQV	KKCKHKCRDERQ FDEQRRDGKQI	DEQRRDGKQI	RRLKYNRQETTL	Sekanslar	
558,3358	1059,5164	1059,506	3173,592	1372,693	1577,8861	M.A. (g/mol)	
48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak proteini	
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite	
0,0823747	0,0842336	0,084234	0,0926072	0,100054	0,102682	PeptideRanker	
ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivitesi (BIOPEP)	
0.4000	0.3333	0.3333	0.1667	0.2727	0.3333	Parametre A (BioPep)	
0.02302461 2514351	0.00073412291 13381	0.00073412291 13381	0.003551246430399 7	0.0077481740299 631	0.00839040335805 43	Parametre B (BioPep)	
10,11	4,03	4,03	9,61	6,47	10,91	pI	

E out	E3	E2	E out	E out	E out	E out	E out	E out	Fraksiyon
KYNRQETTL	KNQDQA	SSTKTFTEEA	ESRVKTEEGRV	RTSA	YTEQVGRI	EPTNRIEA	Sekanslar		
1152,5997	703,3346	1100,524	1289,681	434,2361	965,5068	929,4623	M.A. (g/mol)		
Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	ATP synthase CF1 alpha subunit (chloroplast) [Corylus fargesii]	48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Kaynak proteini		
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksosite		
0,0682554	0,07154	0,071614	0,0754203	0,0784195	0,0788977	0,0801491	PeptideRanker		
ACE inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivitesi (BIOPEP)		
0.2222	0.6667	0.4000	0.3636	0.2500	0.3750	0.3750	Parametre A (BioPep)		
0.010725657784481		0.030379451337193	0.007030506993007		0.00015269886363636	1.25E-5	Parametre B (BioPep)		
8,93	6,19	4,54	6,58	10,11	6,35	4,54	pI		

E out	E2	E out	E out	E out	E out	E2	Fraksiyon
KTEEGRVQV	IQERSSV	KTNDNA	KTNDNAQI	QISREEA	EQYNREV	Sekanslar	
1045,564	818,4413	662,3103	904,4389	832,423	937,4353	M.A. (g/mol)	
48-kDa glycoprotein precursor [Corylus avellana]	ATP synthase CF1 alpha subunit (chloroplast) [Corylus fargesii]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	Cor a 9 allergen [Corylus avellana]	ATP synthase CF1 alpha subunit (chloroplast) [Corylus fargesii]	Kaynak proteini	
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Toksisite	
0,031412	0,046392	0,0520234	0,0574408	0,0578955	0,063387	PeptideRanker	
ACE inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	dipeptidyl peptidase IV inhibitörü	ACE inhibitörü	ACE inhibitörü	Aktivitesi (BIOPEP)	
0.4444	0.4286	0.8333	0.7500	0.1429	0.2857	Parametre A (BioPep)	
0.012802562507973				1.4285714285714E-5	0.0028011204481793	Parametre B (BioPep)	
6,49	6,36	6,19	6,19	4,54	4,54	pI	

EK-4

LC-MS/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda kimotriptik DPP-IV aktif C10 fraksiyonunun fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4.4: Kimotriptik DPP-IV aktif fındık peptitlerin, fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri.

Fraksiyon numarası	Sekanslar	M.A. (g/mol)	Kaynak proteini	Toksosite	PeptideRanker	Aktivitesi (BIOPEP)	Parametre A (BioPep)	pI
C10	ANQLDENPRHFY	1503,695	11S globülin benzeri protein [Corylus avellana]	Yok	0.369063	dipeptidil peptidaz IV inhibitörü	0.4167	5,33
C10	YLAGNPDDDEHQ RQQQQF	2130,956	11S globülin benzeri protein [Corylus avellana]	Yok	0.164729	dipeptidil peptidaz IV inhibitörü	0.5000	4,54
C10	QISREEARLLKY	1548,852	11S globülin benzeri protein [Corylus avellana]	Yok	0.189062	dipeptidil peptidaz IV inhibitörü	0.3333	9,99
C10	ANQLDENPRHF	1340,629	11S globülin benzeri protein [Corylus avellana]	Yok	0.449987	dipeptidil peptidaz IV inhibitörü	0.4545	5,33

EK-5

LC-MS/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda triptik DPP-IV aktif T12 fraksiyonunun fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4.5: Triptik DPP-IV aktif fındık peptitlerin, fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif karakteristikleri.

Fraksiyon numarası	Sekanslar	M.A. (g/mol)	Kaynak proteini	Toksosite	Peptide Ranker	Aktivitesi (BIOPEP)	Parametre A (BioPep)	Parametre B (BioPep)	pI
T12	AADALLK	814,4989	Enolaz [Saccharomyces cerevisiae]	Yok	0,570862	ACE inhibitörü	0.2500	0.00023450764006791	6,19
T12	YDLDFK	800,38	Enolaz [Saccharomyces cerevisiae]	Yok	0,557286	dipeptidil peptidaz IV inhibitörü	0.1667		4,21
T12	ADALLK	743,4646	Enolaz [Saccharomyces cerevisiae]	Yok	0,463886	ACE inhibitörü	0.1429	3.7593984962406E-5	6,19
T12	DALLK	672,4287	Enolaz [Saccharomyces cerevisiae]	Yok	0,344425	dipeptidil peptidaz IV inhibitörü	0.5000	0.0001889366268766	6,19
T12	AVDDFLLSLDGTANK	1578,799	Enolaz [Saccharomyces cerevisiae]	Yok	0,298406	dipeptidil peptidaz IV inhibitörü	0.4000	0.00019332756581079	3,94

T12	T12	T12	T12	T12	T12	Fraksiyon numarası
IATAIEK	GNPTVEVELTTEK	VNQIGTLSESIK	IGSEVYHNLK	SGETEDTFIADLVVGLR		Sekanslar
745,4465	1416,718	1288,709	1159,608	1821,923		M.A. (g/mol)
Enolaz [Saccharomyces cerevisiae]	Enolaz [Saccharomyces cerevisiae]	Enolaz [Saccharomyces cerevisiae]	Enolaz [Saccharomyces cerevisiae]	Enolaz [Saccharomyces cerevisiae]		Kaynak proteini
Yok	Yok	Yok	Yok	Yok		Toksosite
0,077373	0,079724	0,091113	0,239798	0,294641		Peptide Ranker
dipeptidil peptidaz IV inhibitörü	dipeptidil peptidaz IV inhibitörü	dipeptidil peptidaz IV inhibitörü	dipeptidil peptidaz IV inhibitörü	dipeptidil peptidaz IV inhibitörü		Aktivitesi (BIOPEP)
0.5714	0.7692	0.5000	0.4000	0.6471		Parametre A (BioPep)
4.4410396 473815E-5	2.3913290408977E-5			2.2494399456895E-5		Parametre B (BioPep)
6,35	4,26	6,35	7,10	3,92		pI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı -Soyadı: Ahmet Furkan ÇAĞLAR

Doğum Tarihi: 21.03.1992

İletişim: ahmedcaglar@gmail.com

Öğrenim Durumu

Lisans	Akdeniz Üniversitesi- Gıda Mühendisliği	2011-2015
Yüksek Lisans	İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi- Gıda Mühendisliği	2016-2019

Projeler

Türk fıındığı posasının fonksiyonel gıdalarda kullanımının incelenmesi, TÜBİTAK 1001 Programı no:217O063 TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer: Ahmet Furkan ÇAĞLAR

Bildiriler

Kılınç, M., **Caglar, A.F.** (2017). PROPERTIES OF ALKANNA TINCTORIA L. TAUSCH PLANT. 1st INTERNATIONAL CONGRESS on MEDICINAL and AROMATIC PLANTS “Natural and Healthy Life” Konya/ Turkey, 10-12 May.

Cakır, B., Coskun, Ö., **Caglar, A.F.**, Vahapoglu, B., Gulseren, İ., (2019) Production of Plant Protein Concentrate and Hydrolysates from Cold Press Pulps Presentation. Yabited IV. Bitkisel Yağ Kongresi. 18-19 Nisan 2019/ İstanbul

Makaleler

Gulseren, İ., Cakır, B., **Caglar, A.F.** (2019), Preliminary investigations *in vitro* ACE-inhibitory activities of tryptic peptides produced from cold press deoiled hazelnut meals. *The Journal Of Food*. 44 (2): 309-317.

Caglar, M.Y., Kılınç, M., Cakır, B., **Caglar, A.F.**, (2019), Gıda analizlerinde kalite kontrol ve tağşiş için kullanılan spektroskopik teknikler. *Akademik Gıda* 17(1) (2019) 121-130, DOI: 10.24323/akademik-gida.544975.

Sertifikalar

BRC KALİTE VE GIDA GÜVENLİĞİ YÖNETİM SİSTEMLERİ PARS EĞİTİM, DANIŞMANLIK VE MÜHENDİSLİK HİZMETLERİ- 05.2013
TS EN ISO/IEC 17025:2010 LABORATUVAR AKREDİTASYON STANDARDI PARS EĞİTİM, DANIŞMANLIK VE MÜHENDİSLİK HİZMETLERİ- 05.2013
TS EN ISO 19011:2004 İÇ DENETÇİ EĞİTİMİ PARS EĞİTİM, DANIŞMANLIK VE MÜHENDİSLİK HİZMETLERİ- 05.2013
GIDA GÜVENLİĞİ YÖNETİCİSİ SERTİFİKASI PARS EĞİTİM, DANIŞMANLIK VE MÜHENDİSLİK HİZMETLERİ- 05.2013
HELAL GIDA GIDA VE İHTİYAÇ MADDELERİ DENETLEME VE SERTİFİKALANDIRMA- 05.2013
TS EN ISO 22000:2005 GIDA GÜVENLİĞİ YÖNETİM SİSTEMİ PARS EĞİTİM, DANIŞMANLIK VE MÜHENDİSLİK HİZMETLERİ- 03.2013
TS OHSAS 18001 İŞ SAĞLIĞI VE GÜVENLİĞİ YÖNETİM SİSTEMLERİ PARS EĞİTİM, DANIŞMANLIK VE MÜHENDİSLİK HİZMETLERİ- 03.2013
TS EN ISO 22002/PAS 220:2008 GIDA GÜVENLİĞİ HUSUSUNDA ÖN GEREKSİNİM PROGRAMLARI PARS EĞİTİM, DANIŞMANLIK VE MÜHENDİSLİK HİZMETLERİ- 03.2013
TS EN ISO 9001:2008 KALİTE YÖNETİM SİSTEMLERİ PARS EĞİTİM, DANIŞMANLIK VE MÜHENDİSLİK HİZMETLERİ- 03.2013