

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

Fadime Begüm Otağ*, Mehmet Hayta

Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Geliş tarihi / Received: 09.04.2015

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 05.07.2015

Kabul tarihi / Accepted: 14.08.2015

Özet

Bu çalışmada nohuttan elde edilen protein izolatlarındaki ADE inhibisyon aktivitesi ölçülmüştür. Nohutlara pişirme, mikrodalga, ultrason, fermantasyon gibi ön işlemler uygulandıktan sonra aktivitedeki değişiklik araştırılmıştır. Ön işlem uygulanan örneklerden alkali ekstraksiyon ve izoelektrik çöktürme yöntemiyle protein izolatları elde edilmiştir. Bütün izolatlar pepsin ve tripsin ile hidroliz edildikten sonra analiz edilmiştir. En yüksek ADE inhibisyon aktivitesi ultrason uygulanan örneklerde görülmüştür. Aktivite ham nohuta göre yaklaşık %21.0-40.7 oranında artmıştır. Fermantasyon ve kaynatma ön işlemleri sonucu aktivitede azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak nohutun ADE inhibisyon aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmış, ultrason uygulamasının aktiviteyi artırdığı bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Nohut, ADE inhibisyonu, biyoaktifpeptitler, ultrason, mikrodalga, fermantasyon, pişirme

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

Abstract

In this study, ACE inhibitory activity of chickpea protein isolates was measured. After applying pre-treatments such as cooking, microwave, ultrasound and fermentation, changes in activity were investigated. Protein isolates were obtained by alkaline extraction and isoelectric precipitation from samples that were applied pre-treatments. All isolates were analyzed after being hydrolysed with pepsin and trypsin. The highest ACE inhibition activity was observed in samples that were applied ultrasound. The ACE inhibition activity increased about 21.0- 40.7% when compared to the raw chickpea samples. A decline in the activity was observed when pre-treatments such as fermentation and cooking were applied. As a result of these, it has been proved that chickpea has an ACE inhibition activity and it has been found that ultrasound pre-treatment increases ACE inhibition activity.

Keywords: Chickpea, ACE inhibition, bioactive peptides, ultrasound, microwave, fermentation, cooking

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ begumotag@gmail.com, ☎ (+90) 352 437 5755,

☎ (+90) 352 437 5784

GİRİŞ

Yüksek kan basıncı diğer bir deyişle hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar için en önemli risk faktörüdür. Hipertansiyon dünya nüfusunun ciddi bir kesimini tehdit altına almıştır. Ülkemizde her üç kişiden birinde bu hastalık gözlenmektedir (1). Son verilere göre bu hastaların sadece % 54.7'si hipertansiyonun farkındadır (2). Ülkemizde her dört ölümden birinin sebebi hipertansiyondur (3).

Hipertansiyon, hayat tarzının değiştirilmesi, farklı diyet yaklaşımları ve ilaç desteği ile tedavi edilebilmektedir. Ancak sentetik ilaçların kuru öksürük ve kaşıntı gibi yan etkileri insanları doğal materyallerle tedavi yoluna sürüklemiştir (4).

Artan epidemiyolojik kanıtlar kardiyovasküler rahatsızlıklar, obezite, hipertansiyon, diyabet ve hatta kanser gibi hastalıklarla diyet arasında kuvvetli bir bağ olduğunu göstermiştir. Fonksiyonel gıdaların üretilmesi de sağlıklı gıdalar arasında bir ilişki olduğu algısına yanıt niteliğindedir. Bir fonksiyonel gıda genel olarak vücutta bir veya birden fazla fonksiyon üzerinde iyi olma hali sağlayan gıda olarak tanımlanır. Son zamanlarda temel besleyici özelliklerinin dışında gıda prosesi süresince olgunlaşma veya fermantasyon yoluyla, sindirim sırasında enzimler yoluyla oluşan peptitlerin insan sağlığı üzerinde faydalı etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Bu biyoaktif peptitler 2 ile 50 aminoasit uzunluğuna sahiptirler ve antimikrobiyel, antioksidan, antitrombotik, antihipertansif ve opioid aktivite göstererek kardiyovasküler sistem, sindirim, endokrin, bağışıklık ve sinir sistemlerini etkilerler (5, 6).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) vücutta iki sisteme etki ederek kan basıncını düzenler. Bunlardan ilki renin-anjiyotensin sistemidir. ADE bu sistemde bulunan anjiyotensinI'i vazokonstriktör olan anjiyotensinII'ye dönüştürür, aldosteron salınımını indükleyerek sodyum konsantrasyonunu ve dolayısıyla kan basıncını artırır. İkinci sistem ise kinin-kalikrein sistemidir. ADE, vazodilatör olan bradikininin parçalar. Antihipertansif biyoaktif peptitler bu enzimi inhibe ederek kan basıncının düşmesine yardımcı olurlar (7).

Kuru baklagiller iyi birer karbonhidrat, protein ve diyet lif kaynağıdır. Bunun yanında vitamin ve mineral ihtiyacını da karşılarlar. Son derece besleyici olan baklagiller, yüksek kolesterol ve Tip-2 diyabetin düzenlenmesi, bazı kanser

türlerinin önlenmesi gibi birçok sağlık özelliğine de sahiptirler (4).

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

Bu çalışmada nohuttan enzim muamelesi ile elde edilen biyoaktif peptitlerin ADE inhibitör aktivitesi üzerine ultrason, mikrodalga, fermantasyon ve pişirme gibi gıda proseslerinin etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada materyal olarak Kayseri'de yerel bir firmadan alınan nohut (*Cicer arietinum* L) kullanılmıştır. *Lactobacillus plantarum* (ATCC kodu 8014) Mikrobiologics'ten, pepsin, tripsin, ADE ve HHL Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir.

Öğütme

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

Nohut protein izolatu eldesi

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

Fermantasyon

Öğütülmüş nohut örneklerine %10 (v/v) *Lactobacillus plantarum* eklenerek steril distile

suyla 200 g/L süspansiyon hazırlanmıştır. 48 saat boyunca 150 rpm hızdaki çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de inkübasyona bırakılarak fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Fermantasyondan sonra örnekler -20 °C'de muhafaza edilmiştir (8).

Piştirme

Bütün haldeki nohut örneklerine beherde 1:10 oranında (w/v) su ilave edilerek 60 dakika boyunca 100 °C'de kaynatılarak pişirilmiştir. Kaynatma sırasında su ilavesiyle seviyesinin sabit kalması sağlanmıştır. İşlem sonunda örnekler süzülerek oda sıcaklığına soğutulmuş ve öğütülmüştür. Isıl işlemlerde sıcaklık ve süre belirlenirken nohutun yenilebilecek kadar yumuşamış olması göz önünde bulundurulmuştur.

Ultrason Uygulaması

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

Mikroalga Uygulaması

Bütün haldeki örnekler beherde 1:10 oranında (w/v) su ilave edilerek 20 dakika boyunca 2450 MHz'te mikroalga (MW796, Kenwood, Çin) uygulanmıştır. İşlem sonunda örnekler süzülerek oda sıcaklığına soğutulmuş ve öğütülmüştür.

Protein Hidrolizi

Protein izolatından 100 mL alınarak 2 M HCl ile pH 2'ye ayarlanmıştır. 1/250 (w/w) enzim substrat oranında pepsin eklenerek 37 °C'de inkübasyona bırakılmış, 2 saat sonra pH 6.5'e ayarlanarak yine 1/250 (w/w) enzim substrat oranında tripsin eklenerek solüsyon 37 °C'de 2.5 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda pH 4.5'e ayarlanarak 4 °C'de 4000rpm hızda 15 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant -20 °C'de muhafaza edilmiştir (9).

Protein Miktarının Belirlenmesi

Nohutten elde edilen izolatların ve enzimatik hidroliz sonrası elde edilen hidrolizatların protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir.

ADE İnhibisyon Aktivitesi

Aktivite tayini bazı modifikasyonlarla Cushman and Cheung (10) metodu esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu metotta hippuril-L-histidil-L-lösin (HHL)'den, ADE aktivitesi sonucu oluşan

hippurik asit absorbansı ölçülmektedir. Analize başlamadan önce 5 mmol/L HHL çözeltisi 0.3 M NaCl içeren 0.1 M sodyum borat tamponunda çözülerek hazırlanmıştır. 0.1 U/mL ADE çözeltisi aynı tamponla hazırlanmıştır. 20 µL HHL ile 80 µL protein hidrolizati karıştırılarak 37 °C'de 5 dakika bekletilmiş daha sonra 20 µL ADE çözeltisi eklenerek 37 °C'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 100 µL 1M HCl çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Hippurik asit ekstraksiyonu için 1.2 mL etil asetat eklenerek vortekslenerek 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan etil asetat 1mL alınarak temiz bir tüpe aktarılarak, 100 °C'deki tabaka ısıtıcı kullanılarak etil asetat tamamen uçurulmuştur. Kalan kısım 3 mL saf su ile çözülerek 228 nm'de absorbansı okunmuştur. ADE inhibitör aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibasyon} = \frac{B - A}{B - C} \times 100$$

A: örnek absorbansı

B: kör absorbansı (örnek yok)

C: pozitif kontrol absorbansı (ADE yok)

İstatistik Analiz

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

SONUÇ ve TARTIŞMA

Örneklerin protein miktarları 2.66 ile 1.66 mg/mL arasında değişmektedir. Sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir. Mikroalga dışındaki uygulamalar protein miktarında azalmaya sebep olmuştur. Baklagiller kullanılarak yapılan çalışmalarda örneklerin pişirilmesiyle protein miktarında azalma gözlenmiş ve sebebi piştirme sırasında çözülebilir katılarda yaşanan kayıplar olarak açıklanmıştır (11). Nohut kullanılan başka bir çalışmada ise pişirmenin toplam protein içeriğini %3.4 azalttığı, bunun sebebinin de proteinlerin piştirme suyuna geçişi olduğu bildirilmiştir (12).

Hidroliz verimi ısıl işlemler ve fermantasyon ile artmıştır. Hidrolizatlardaki protein miktarı arasında istatistik olarak bir fark görülmemiştir. Hidroliz sonrası protein miktarı ve hidroliz verimi Çizelge 2'de verilmiştir. Hidroliz verimi en fazla kaynatılmış örneklerde izlenmiştir (%30.69). Termal prosesler,

Çizelge 1. Protein miktarı
Table 1. Content of protein

Örnek Adı Sample Name	Protein miktarı (mg/mL) Content of protein(mg/mL)
Ham nohut <i>Raw Chickpea</i>	2.50 ± 0.61 ^a
Fermente nohut <i>Fermented Chickpea</i>	1.94 ± 0.35 ^{ab}
Piştirilmiş nohut <i>Cooked Chickpea</i>	1.67 ± 0.5 ^b
Ultrason uygulanmış nohut <i>Chickpea applied ultrasound</i>	1.66 ± 0.26 ^b
Mikrodalga uygulanmış nohut <i>Chickpea applied microwave</i>	2.66 ± 0.3 ^a

Aynı sütündeki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P < 0.05$). Different small letters in the same column refers to statistically significant difference ($P < 0.05$).

pişirmeden sonra proteinlerde konformasyonel değişiklik olduğundan, proteolitik enzimlerin etkisini artırmaktadır (13). Nohut kullanılan bir çalışmada *in vitro* protein sindirilebilirliği ısı işlem sonucu artmıştır. Sindirilebilirlikteki bu artışın protein denatürasyonu, tripsin inhibitörlerinin yıkımı veya taninler ve fitik asidin azalmasından dolayı olabileceği bildirilmiştir (14). Sorgum ile yapılan bir çalışmada ise fermantasyon sonucu *in vitro* protein sindirilebilirliği artmış ve sebebi tripsin inhibitörleri ve taninler gibi besleyici olmayan faktörlerin azalması olarak açıklanmıştır (15).

Örneklerin hepsinde oldukça yüksek oranda ADE inhibitör aktivitesi gözlenmiştir. İnhibisyon çalışmalarında örnek çok yoğun olduğunda %100'ün üzerinde sonuçlar bulunabilmektedir. Şekil 1'de çeşitli işlemler uygulanmış nohutların ADE inhibisyon aktiviteleri gösterilmiştir. ADE inhibisyonunda en yüksek aktivite ultrason uygulanan örneklerde izlenmiştir. ADE inhibisyon aktivitesinde kontrole göre yaklaşık %14'lük bir artış olmuştur. Bu artış istatistik açıdan önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Buğday çimi kullanılan bir çalışmada ultrasonik ön işlemin ADE inhibitör aktivitesini %21-40.7 oranında artırdığı belirtilmiştir. Bunun sebebi aminoasit konsantrasyonu ile açıklanmıştır. Ultrason ön işlemi uygulanan örneklerde hidrofobik amino asit miktarının,

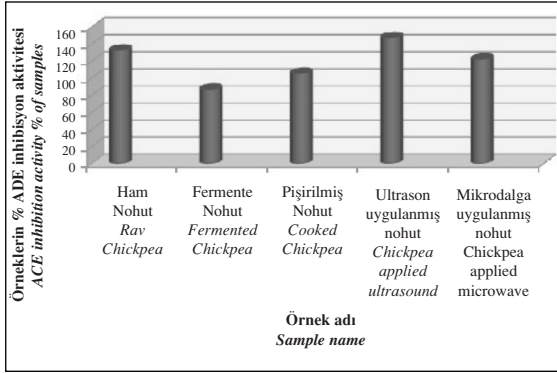
özellikle prolin miktarının önemli derecede arttığı gösterilmiştir (16). Bu, ultrasonik ön işlem gören hidrolizatların C-terminalinde prolin içeren peptit miktarının daha fazla olabileceğini kanıtlar niteliktedir. Bilindiği gibi C-terminalinde prolin içeren peptitler ADE inhibisyonu bakımından diğer peptitlere oranla daha yüksek aktivite göstermektedir. Prolin aynı zamanda bu peptitlerin stabilitesinde önemli rol oynamaktadır. Özellikle C-terminalinde bulunan prolin, genellikle ADE inhibitör peptitlere sindirim enzimleri tarafından parçalanmasına karşı direnç kazandırır (17). Bir diğer çalışmada ise ultrasonun ADE inhibitör peptitlerin üretimini artırdığı ve aktivitenin maksimuma ulaşması için geçen süreyi kısalttığı bildirilmiştir (18). Sonikasyon sırasındaki enzimatik hidrolizdeki artmanın kaviteasyon sebebiyle difüzyonun artışıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Fermantasyon sonucunda ADE inhibitör aktivitede azalma meydana gelmiştir ($P > 0.05$). Literatürdeki diğer çalışmalarla çelişen bu azalmanın kullanılan bakteri türü veya fermantasyon koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Soya ile yapılan çalışmada iki haftalık fermantasyon süresi boyunca aktivitenin arttığı ancak süre uzadıkça aktivitenin azalmaya başladığı görülmüştür. ADE inhibitör aktivitesine sahip peptitlerin, peptit hidrolizi gibi sebeplerle tüketiminin ADE

Çizelge 2. Hidroliz edilen örneklerin protein miktarı
Table 2. Protein content of hydrolyzed samples

Örnek Adı Sample Name	Protein miktarı (mg/mL) Content of protein(mg/mL)	Hidroliz verimi (%) Yield of hydrolysis (%)
Ham nohut <i>Raw Chickpea</i>	0.249 ± 0.27 ^a	9.96
Fermente nohut <i>Fermented Chickpea</i>	0.324 ± 0.03 ^a	16.69
Piştirilmiş nohut <i>Cooked Chickpea</i>	0.513 ± 0.17 ^a	30.69
Ultrason uygulanmış nohut <i>Chickpea applied ultrasound</i>	0.353 ± 0.16 ^a	21.27
Mikrodalga uygulanmış nohut <i>Chickpea applied microwave</i>	0.577 ± 0.03 ^a	21.71

Aynı sütündeki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P < 0.05$). Different small letters in the same column refers to statistically significant difference ($P < 0.05$).



Şekil 1. Örneklerin %ADE inhibisyon aktivitesi
Figure 1. ACE inhibition activity % of samples

inhibitör aktivitenin azalmasında etkili olabileceği bildirilmiştir (19).

Piştirme sonucunda ADE inhibitör aktivitenin %18.6 azaldığı görülmüştür ($P>0.05$). Sıcaklık farklı materyallerde farklı etkilere sebep olabilmektedir. Kuru baklagillerle yapılan pek çok çalışmada ısı işlem ADE inhibisyon aktivitesinde artışa sebep olmuştur. Kuru fasulyeyle yapılan bir çalışmada 15 dakika kaynatılarak elde edilen hidrolizatların ısı işlem uygulanmayan hidrolizatlara göre daha yüksek ADE inhibitör aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir (20). Kuru fasulye, barbunya ve yeşil mercimeğin kullanıldığı bir diğer çalışmada 121 °C'de 50 dakikalık ısı işleminin üç örnekte de ADE inhibitör aktivitesini artırdığı bulunmuştur (21). ADE inhibitör peptitlerin aktivitesiyle yapısı arasındaki ilişki hala tam olarak bilinmemektedir. Fakat ADE'nin bağlanması için en önemli faktörün C-terminal dizisi olduğu düşünülmektedir. C-terminaldeki lisin ve arjinin gibi pozitif yüklü aminoasitlerin varlığı inhibitör potansiyelini artırabilir. Yüksek sıcaklıklardaki ısı işlem C-terminal dizisini değiştirebilir ve böylece ADE inhibitör aktivitesini etkileyebilir (22).

Mikrodalga'nın ADE inhibisyon aktivitesine etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın sonucunda ise mikrodalga uygulamasının ADE inhibitör aktiviteyi %4.5 artırdığı bulunmuştur ($P>0.05$).

Sonuç olarak nohutun ADE inhibisyon aktiviteye sahip olduğu bulunmakla beraber, aminoasit içeriğinin belirlenmesinin aktivitenin kaynağını anlamak bakımından faydalı olabileceği düşünülmektedir. Özellikle mikrodalga'nın antihipertansif aktivite üzerine etkilerinin anlaşılması bakımından daha detaylı incelemelerin yapılması önemlidir.

Teşekkür

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FYL-2013-4273 kodlu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. http://www.turkhipertansiyon.org/pdf/Turk_Hipertansiyon_Prevalans_Calismasi_Ozeti1.pdf. (Erişim tarihi: Mayıs 2013)
2. http://www.turkhipertansiyon.org/prevalans_calismasi_2.php. (Erişim tarihi: Mayıs 2013)
3. http://www.turkhipertansiyon.org/insidans_160608.php. (Erişim tarihi: Mayıs 2013)
4. Roy F, Boye J I, Simpson B K. 2010. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Res Int*, 43 (2): 432- 442.
5. Meisel H, Fitzgerald R J. 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharm Design*, 9:1289-1295.
6. Lopez-Exposito I L, Recio I. 2008. Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumour properties. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Bosze Z (ed), Volume 606, Springer Science and Business Media, New York, pp.271-293.
7. Hernández-Ledesma B, del Mar Contreras M, Recio I. 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv Colloid Interface Sci*, 165: 23-35.
8. Fernandez-Orozco R, Frias J, Muñoz R, Zielinski H, Piskula M K, Kozłowska H, Vidal-Valverde C. 2007. Fermentation as a bio-process to obtain functional soybean flour. *J Agric Food Chem*, 55 (22): 8972-8979.
9. Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr*, 92:357-366.
10. Cushman D W, Cheung H S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol*, 20 (7): 1637-1648.
11. Wang N, Hatcher D W, Tyler R T, Toews R, Gawalko EJ. 2010. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Food Res Int*, 43: 589-594.

12. Clemente A, Sanchez-Vioque R, Vioque J, Bautista J, Millan F. 1998. Effect of cooking on protein quality of chickpea (*Cicer arietinum*) seeds. *Food Chem*, 62 (1): 1-6.
13. Rodrigues M, Marques Soares R A M, Carlos A C C, Siguemoto E S, Fontanari G G, Arêas J A G. 2014. Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilization into micelles. *Food Chem*, in press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.049>
14. Alajaji S A, El-Adawy T A. 2006. Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *J Food Comp Anal*, 19: 806-812.
15. Osman M A. 2004. Changes in sorghum enzyme inhibitors, phytic acid, tannins and in vitro protein digestibility occurring during Khamir (local bread) fermentation. *Food Chem*, 88: 129-134.
16. Jia J, Maa H, Zhao W, Wang Z, Tian W, Luo L, He R. 2010. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chem*, 119 (1): 336-342
17. Li G H, Le G W, Shi Y H, Shrestha S. 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, 24(7): 469-486.
18. Madadlou A, Sheehan D, Emam-Djomeh Z, Mousavi M E. 2011. Ultrasound-assisted generation of ACE-inhibitory peptides from casein hydrolyzed with nanoencapsulated protease. *J Sci Food Agric*, 91 (11): 2112-2116.
19. Wang H, Li Y, Cheng Y, Yin L, Li L. 2013. Effect of the Maillard reaction on angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity of douchi during fermentation. *Food Bioprocess Tech*, 6 (1): 297-301.
20. Rui X, Boye J I, Simpson B K, Prasher S O. 2012. Angiotensin I converting enzyme inhibitory properties of *Phaseolus vulgaris* bean hydrolysates: Effect of different thermal and enzymatic digestion treatments. *Food Res Int*, 49 (2): 739-746.
21. Akıllıoğlu H G. 2009. Bazı Kurubaklagillerden Elde Edilen Protein Ekstraktları ve Fraksiyonlarının ADE İnhibisyon Aktiviteleri: Isıl İşlem ve *In Vitro* Sindirilirliğin Etkisi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İzmir, Türkiye, 104 s.
22. Lopez-Fandino R, Otte J, van Camp J. 2006. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *Int Dairy J*, 16 (11):1277-1293.