

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**Bazı Kurubaklagillerden Elde Edilen Protein Ekstraktları
ve Fraksiyonlarının ADE İnhibisyon Aktiviteleri: Isıl
İşlem ve *in vitro* Sindirilirliğin Etkisi**

Halise Gül AKILLIOĞLU

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 614. 01. 00

Sunuş Tarihi: 13.02.2009

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sibel KARAKAYA

Bornova-İZMİR

III

Halise Gül AKILLIOĞLU tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak sunulan “**Bazı Kurubaklagillerden Elde Edilen Protein Ekstraktları ve Fraksiyonlarının ADE İnhibisyon Aktiviteleri: Isıl İşlem ve *in vitro* Sindirilirliğin Etkisi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 13.02.2009 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oy birliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı :

.....

Raportör Üye:

.....

Üye :

.....

ÖZET

Bazı Kurubaklagillerden Elde Edilen Protein Ekstraktları ve Fraksiyonlarının ADE İnhibisyon Aktiviteleri: Isıl İşlem ve *in vitro* Sindirilirliğin Etkisi

AKILLIOĞLU, Halise Gül

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sibel KARAKAYA

Şubat, 2009, 104 sayfa

Bu çalışmada kuru fasulye, kuru barbunya ve yeşil mercimeğin potansiyel Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) inhibisyonu etkileri belirlenmiş ve bu etkinin *in vitro* sindirim sonrasında devam edip etmediği araştırılmıştır. Kurubaklagillerin Pronase E ile hidrolizinden sonra ultrafiltrasyonla elde edilen fraksiyonlarının önemli derecede ADE inhibisyonu aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen fraksiyonların IC₅₀ değerlerinin 43.66±0.40 ile 106.54±15.21 µg/mL arasında değiştiği saptanmıştır. Molekül ağırlığı 5000 Da' dan büyük olan fraksiyonun her üç kurubaklagil için de en fazla ADE inhibisyonu aktivitesi gösteren fraksiyon olduğu (p<0.05) belirlenmiştir. 30 dakikalık ısıl işlemin barbunya ve mercimeğin ADE inhibisyonu aktivitesinde azalmaya yol açtığı (p<0.05); ancak 50 dakikalık ısıl işlemin ADE inhibitörü peptitlerin açığa çıkması açısından üç kurubaklagil için de yararlı olduğu belirlenmiştir. *In vitro* sindirim işleminin kurubaklagillerin ADE inhibisyonu aktivitesini arttırdığı saptanmıştır (p<0.05). 50 dakikalık ısıl işlemi takiben uygulanan *in vitro* sindirim sonrasında elde edilen

barbunya mide diyalizatının %ADE inhibisyonunun mercimekten elde edilen değerden yüksek olduğu ($p<0.05$) ancak fasulye ile benzer olduğu ($p>0.05$); ince bağırsak diyalizatlarında ise örnekler arasında istatistiksel açıdan fark olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: ADE inhibisyonu aktivitesi, kuru fasulye, kuru barbunya, yeşil mercimek, ısıtılma işlemi, *in vitro* sindirim, enzimatik hidroliz.

VII

ABSTRACT

ACE Inhibitory Activity Of Protein Extracts and Fractions Obtained From Some Legume Species: Effects Of Heat Processing and *in vitro* Digestion

AKILIOĞLU, Halise Gül

Master Thesis in Food Engineering Department

Supervisor: Prof. Dr. Sibel KARAKAYA

February, 2009, 104 pages

In this research potential Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitory activity of common dry beans, red colored kidney beans and lentils were determined and stability of the ACE inhibitory activity after *in vitro* digestion was investigated. The ultrafiltration fractions obtained following Pronase E digestion showed significant amount of ACE inhibitory activity. It was found that the fractions had IC₅₀ values changing from 43.66±0.40 to 106.54±15.21 µg/mL. The most potent inhibitory activity was obtained for the fraction that has molecular weight over 5000 Da (p<0.05) for each legume species. 30-min heat process resulted in a decrease in ACE inhibitory activity of red colored kidney beans and lentils; however, 50-min heat process was observed to be beneficial for the release of ACE inhibitory peptides from the three legume species (p<0.05). *In vitro* digestion process increased ACE inhibitory activity of the samples (p<0.05). ACE inhibitory activity of dialysate obtained from *in vitro* gastric digestion of red colored kidney beans obtained after *in vitro* digestion following 50-min heat process was

higher than the dialysate of lentils obtained from gastric digestion, but similar with the dialysate of common beans.. However, the dialysates obtained from *in vitro* intestine digestion showed similar ADE% inhibitory activity ($p>0.05$).

Key words: ACE inhibitory activity, common dry beans, red colored kidney beans, lentils, heat process, *in vitro* digestion, enzymatic hydrolysis.

IX

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca benden yardımını esirgemeyen, bana her zaman destek olan, akademik çalışmalarım için beni her zaman teşvik eden değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sibel KARAKAYA' ya,

Akademik çalışmalarım konusunda beni teşvik eden ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sedef Nehir EL' e,

Bilgi, deneyim ve önerilerini bizimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU ve Biyokimya Bölümü Araştırma Görevlilerine,

Deneyimlerini benimle paylaşan Dr. Gülfem ÜNAL' a,

Desteği, yardımı, önerileriyle beni hiç yalnız bırakmayan sevgili arkadaşım Ar. Gör. Şebnem ŞİMŞEK' e çok teşekkür ederim.

Göreve başlamış olmama rağmen, tez çalışmalarımı tamamlamak üzere verdikleri izinden dolayı Abant İzzet Baysal Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dekanlığı' na ve Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığı' na,

Tez projemin gerçekleştirilebilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan TÜBİTAK TOVAG Grubu' na ve EBİLTEM' e teşekkür ederim.

Bana her zaman maddi ve manevi destek olan sevgili aileme, çalışmalarım boyunca gösterdikleri anlayış ve teşvikten dolayı sonsuz teşekkür ederim.

XI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XVIII
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Beslenme-Sağlık İlişkisi.....	4
2.1.1. Fonksiyonel gıdalar	5
2.2. Hipertansiyon	6
2.3. Biyoaktif Peptitler	10
2.3.1. Gıda kaynaklı biyoaktif peptitler	11

XII

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.1.1. <u>Opioid peptitler</u>	13
2.3.1.2. <u>Mineral bağlayan peptitler</u>	14
2.3.1.3. <u>Bağışıklık sistemini düzenleyici (immünomodülatör)</u> <u>peptitler</u>	15
2.3.1.4. <u>Sitomodülatör peptitler</u>	15
2.3.1.5. <u>Antitrombotik peptitler</u>	16
2.3.1.6. <u>Antioksidan peptitler</u>	16
2.3.1.7. <u>Hipokolesterolemik peptitler</u>	16
2.3.1.8. <u>Antimikrobiyal peptitler</u>	17
2.3.1.9. <u>İştah azaltıcı peptitler</u>	17
2.3.1.10. <u>Antihipertansif (ADE inhibitörü) peptitler</u>	18
2.3.1.10.1. <u>Süt ve süt ürünleri kaynaklı ADE inhibitörü peptitler</u>	21
2.3.1.10.2. <u>Et ve et ürünleri ile su ürünleri kaynaklı ADE</u> <u>inhibitörü peptitler</u>	29

XIII

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.1.10.3. <u>Tahıl ve baklagil kaynaklı ADE inhibitörü peptitler</u>	31
2.3.1.10.4. <u>Diğer gıda kaynaklı ADE inhibitörü peptitler</u>	34
3. MATERYAL VE METOT	36
3.1. Materyal	36
3.1.1. Hammadde	36
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	36
3.2. Metot	37
3.2.1. Kullanılan Cihazlar	37
3.2.2. Analizler	39
3.2.2.1. <u>Hammadde Protein İçeriklerinin Belirlenmesi</u>	39
3.2.2.2. <u>Ham Protein Ekstraktı Eldesi</u>	40
3.2.2.3. <u>Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi</u>	43

XIV

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.2.4. <u>Enzimatik Hidroliz Sırasında Mikrobiyal Gelişimin</u>	
<u>İzlenmesi</u>	43
3.2.2.5. <u>Protein Hidrolizatlarının Fraksiyonlara Ayrılması</u>	45
3.2.2.6. <u>Isıl İşlem Uygulaması</u>	45
3.2.2.7. <u>Isıl İşlem Uygulanmış Kuru Baklagillerden Protein</u>	
<u>Ekstraktı Eldesi</u>	45
3.2.2.8. <u>in vitro Sindirim</u>	46
3.2.2.9. <u>ADE İnhibisyonu Aktivitesinin Belirlenmesi</u>	47
3.2.2.10. <u>Örneklerin Protein İçeriklerinin Belirlenmesi</u>	50
3.2.2.11. <u>İstatistiksel Analiz</u>	52
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	53
4.1. Kuru Baklagillerin Protein İçerikleri	53
4.2. Protein Ekstraktı Eldesi.....	54
4.3. Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi.....	55

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4. Isıl İşlemin ADE İnhibisyonu Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	62
4.5. <i>In vitro</i> Sindirim.....	69
5. SONUÇ.....	79
KAYNAKLAR DİZİNİ	86
EKLER	
Ek 1. Beklenen doygunluk yüzdesine ulaşmak için gerekli olan amonyum sülfat miktarları çizelgesi.....	101
Ek 2. Fasulye örneğinin enzimatik hidrolizinden elde edilen MA<3000 Da fraksiyonunun IC ₅₀ değerinin hesaplanması.....	102
Ek 3. IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesi için çizilen doz-inhibisyon eğrileri.....	103
ÖZGEÇMİŞ.....	104

XVII

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kan basıncının düzenlenmesinde ADE' nin rolü.....	19
3.1. Enzimatik hidroliz sırasındaki ekim sonuçları.....	44
3.2. Isıl işlem uygulanmış örneklerden protein ekstraktı elde etme yöntemi.....	46
3.3. Bradford reaktifine ait kalibrasyon grafiği.....	51
4.1. A) Fasulyeye, B) Barbunyaya, C) Mercimeğe uygulanan farklı ısıl işlem parametrelerinin ADE inhibisyonu aktivitesi üzerine etkisi...63	
4.2. A) Çiğ, B) 15 dakika ısıl işlem uygulanmış kuru baklagillerin ADE Inhibisyonu aktiviteleri.....	67
4.3. A) 30 dakika, B) 50 dakika ısıl işlem uygulanmış kuru baklagillerin ADE inhibisyonu aktiviteleri	68
4.4. A) Fasulye, B) Barbunya, C) Mercimek örneklerinin ADE inhibisyonu aktiviteleri üzerine in vitro sindirim prosesinin etkisi..73	

XVIII
ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kan basıncının sınıflandırılması	8
2.2. Hipertansiyonla mücadele için öneriler	9
2.3. Çeşitli protein kaynaklarından elde edilmiş biyoaktif peptitler... ..	12
2.4. Biyoaktif peptitlerin fizyolojik fonksiyonları	13
2.5. Bazı süt ürünlerinden elde edilmiş peptitler ve IC ₅₀ değerleri.....	27
2.6. Mısır gluteni fraksiyonlarının IC ₅₀ değerleri.....	31
3.1. Kuru baklagil örneklerinin izoelektrik noktaları	41
4.1. Kuru baklagillerin protein içerikleri	53
4.2. 30 dakika ısıtılmış uygulanmış barbunyadan farklı çöktürme yöntemleriyle elde edilen ekstraktların protein içerikleri.....	54
4.3. Kuru baklagillerde enzimatik hidroliz öncesinde belirlenen protein miktarı ve enzimatik hidroliz sonrasında elde edilen fraksiyonların protein miktarları.....	57

XIX

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.4. Enzimatik hidroliz sonrasında elde edilen fraksiyonların.....58 ADE inhibisyon aktiviteleri (%).	
4.5. Enzimatik hidroliz sonrasında elde edilen fraksiyonların IC ₅₀ değerleri.....59	
4.6. Isıl işlem sonrası in vitro sindirimden elde edilen diyalizatların protein içerikleri.....71	
4.7. Fasulye örneklerinin in vitro sindirim sonrasındaki IC ₅₀ değerleri..72	
4.8. Barbunya örneklerinin in vitro sindirim sonrasındaki IC ₅₀ değerleri.....73	

1. GİRİŞ

Baklagiller genellikle çeşitleri bakımından bölgesel ürünler olmakla birlikte dünyada, tahıllardan sonra en fazla tarımı yapılan ürünlerdir (de Almeida Costa et al., 2006; Duranti, 2006; Vijayakumari et al., 2007). Tüm dünyada insan beslenmesinde önemli yer tutan baklagiller, uzun yıllardan beri dünya mutfağında farklı çeşitleriyle yerini korumaktadır.

Genel olarak baklagiller kompleks karbonhidrat, protein ve diyet lifi kaynağıdır. Ayrıca vitamin, karotenoidler ve fenolik bileşikler gibi besin ögesi olan ve olmayan bileşenleri içerirler. Karbonhidrat içerikleri %55 ile %60 arasında, protein içerikleri %17 ile %40 arasında değişir (de Almeida Costa et al., 2006; Duranti, 2006; Osorio-Diaz et al., 2002). Proteinin büyük kısmı depo proteinleridir. Depo proteinlerinin de çoğunu globulinler oluşturmaktadır (Scarafoni et al., 2007).

Üreticilerin ‘fakirin eti’ tabiriyle adlandırdığı baklagiller, bir bağlamda hayvansal kaynaklı proteinlere alternatif olarak da değerlendirilmektedir (Adebowale et al., 2007). Artan dünya nüfusu ve gıda kaynaklarının yetersiz kalması, özellikle gelişmekte olan ülkelerde protein yetersizliğine bağlı sağlık sorunlarını beraberinde getirmiştir. Baklagillerin protein kaynağı olarak ele alınmasındaki asıl neden bu durumdur.

Bitkisel protein kaynaklarının gıda sistemlerinde bileşen olarak değerlendirilmesi konusuna artan bir ilgi vardır. Gelişmiş ülkelerde bitkisel proteinler zorunlu besin ögesinden ziyade çeşitli fonksiyonel bileşen ya da biyoaktif bileşen olarak kabul edilmektedir. Baklagil

proteinleri de, bu çerçevede yapılan araştırmalarda önemli yer tutmaktadır (Adebowale et al., 2007).

Kuru baklagillerin lipid hemostazi kontrolü, hipokolesterolemik etki, glisemik kontrol, antikarsinojen etki (proteaz inhibitörleri ve lektinlerin etkisi), obezite ve diyabet üzerinde terapötik etkileri (α -amilaz ve protein inhibitörlerinin etkisi) gibi sağlık faydaları deneysel, epidemiyolojik ve klinik çalışmalarda ortaya konmuştur (Dueñas et al., 2006; Duranti, 2006; Xu & Chang, 2008). Adebamowo et al., (2005), fasulye ve mercimek tüketimiyle meme kanseri riski arasında negatif yönlü bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Multiethnik vaka kontrol (Multiethnic case control) çalışmasında soya fasulyesi dışındaki baklagillerin prostat kanserine karşı koruyucu etkisi olduğu saptanmıştır (Kolonel et al., 2000). Soya fasulyesi (Wu and Ding, 2002), mung fasulyesi (Li et al., 2005), nohut (Yust et al., 2003) ve bezelyede (Vermeirssen et al., 2004; 2005) antihipertansif etki gösteren peptitlerin varlığı tespit edilmiş ve hayvan denemeleriyle bu peptitlerin antihipertansif etkileri kanıtlanmıştır.

Bugün hipertansiyon, dünya popülasyonunun yaklaşık $\frac{1}{4}$ 'ini etkileyen ve kardiyovaskular hastalıklar ve ilişkili komplikasyonlar için başlıca, ancak kontrol edilebilen bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Bir dipeptil karboksipeptidaz olan anjiotensin I dönüştürücü enzimi (ADE), anjiotensin I'in (dekapeptit) potansiyel vazokonstrüktör anjiotensin II'ye (oktapeptit) dönüşümünü katalizleyen ve memelilerde kan basıncı ile sıvı ve tuz dengesini düzenleyen bir enzimdir. Bu enzimin aktivitesini azaltarak kan basıncı seviyesinin düzenlenmesinde rol oynayan bileşenler ADE inhibitörü olarak adlandırılmaktadır. Eksojen kaynaklı ADE inhibitörü ilk olarak yılan zehirinden izole edilmiştir.

Daha sonra süt, balık ve et kaynaklı olmak üzere bir çok gıdadan izole edilmişlerdir (Hartmann and Meisel, 2007).

Kurubaklagiller, protein bakımından zengin olan gıda grupları arasında et, süt ve yumurtadan sonra yer almaktadır. ADE inhibitörü peptitlerin varlığı ve ADE inhibisyon aktiviteleri ile ilgili olarak et, balık, süt ve yumurtanın materyal olarak kullanıldığı araştırmalar yapılmıştır (Hong et al., 2008). Ancak kurubaklagillerin potansiyel biyoaktif peptit içerikleri ile ilgili yapılmış çalışmalar sınırlıdır. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın üretim istatistiklerine göre 2003 yılında yaklaşık 500.000 ton civarında kuru fasulye ve mercimek üretilmiştir. Türk halkının beslenme modelinde kurubaklagiller önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle kurubaklagil proteinlerinin potansiyel ADE inhibitörü etkilerinin belirlenmesi ve bu etkinin *in vitro* sindirim sonrasında devam edip etmediğinin araştırılması önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada birinci aşama olarak bazı kuru baklagillerden elde edilen protein ekstraktlarının ve protein fraksiyonlarının ADE inhibisyon etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. İkinci aşamada ise ısıl işlem uygulaması ve *in vitro* sindirimi takiben ADE inhibisyon etkisindeki olası farklılıkların ortaya konması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Beslenme-Sağlık İlişkisi

Beslenme, insanlığın başlangıcından bu yana önemini korumuş ve hatta insanlığın gelişimine paralel olarak önemi artmıştır. Eski zamanlarda beslenme, avlanabilen hayvanlar ve doğadaki yabani meyveler ile sınırlıyken tarımın başlamasıyla birlikte beslenmede çeşitlilik artmıştır. Endüstrileşmeyle beraber ise gıda ürünlerindeki artışla insanlara geniş bir yelpaze sunulmuştur. Beslenme ilk çağlarda sadece karın doyurmada ibaret gibi gözükse de aslında sağlıkla olan ilişkisi her zaman için ilgi çekici olmuştur. MÖ 460-377 yıllarında yaşamış olan Hipokrat' ın şu sözleri konunun önemini çok eski zamanlardan beri farkında olduğunu göstermektedir: 'Sağlıklı olmak insanın yapısını (genetik) ve çeşitli gıdaların gücünü bilmeyi gerektirir. Ancak yalnızca yemek yemeği kontrol etmek yeterli değildir. Aynı zamanda sağlığı olumlu etkilediği bilinen egzersiz de uygulanmalıdır. Gıda alımında veya egzersizde herhangi bir yetersizlik olursa hastalık kaçınılmazdır'.

Günümüzde gıda, beslenme ve sağlık ilişkisi üzerinde en yoğun çalışmaların yapıldığı araştırma alanlarının başında gelmektedir. Özellikle 20. yüzyılın sonlarında fonksiyonel gıda biliminin gelişmesi ve fonksiyonel gıdaların pazarda yüksek katma değer yaratan prestijli ürünler olarak yer alması, gıda sanayinin bu tür ürünler üretmesine ve yeni ürün geliştirme stratejilerinde fonksiyonel gıdalara önemli miktarda bütçe ayırmalarına neden olmuştur.

2.1.1. Fonksiyonel gıdalar

Fonksiyonel gıdalar, terim olarak dünyaca benimsenmiş tam karşılığı bulunmamakla birlikte yaygın olarak ‘beslenme açısından yeterli olmanın yanı sıra, vücutta bir veya birden fazla hedef fonksiyon üzerine, iyi olma halinin güçlendirilmesi ve/veya hastalık riskinin azaltılması gibi, olumlu etkiler sağlayan gıda’ olarak tanımlanmaktadır (Bech-Larsen and Grunert, 2003; Urala and Lähteenmäki, 2004; Patch et al., 2005; Howlet, 2008). Fonksiyonel gıdaları konvansiyonel gıdalardan ayıran en önemli özellik, belirli bir bileşenin tanımlanmış olan fizyolojik etkiyle direkt olarak bağlantılı olmasıdır (Urala and Lähteenmäki, 2004). Bu bileşen fonksiyonel bileşen olarak adlandırılır. Gıdalarda bulunan fenolik bileşikler, likopen, ω -3 yağ asidi, diyet lifi, biyoaktif peptitler birer fonksiyonel bileşendirler. Fenolik bileşiklerin reaktif oksijen türlerinin tetiklediği dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etkisi olduğu (Jung et al, 2008), likopenin özellikle prostat kanseri riskini azaltıcı etkisi olduğu (Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2005), ω -3 yağ asidinin trigliserit seviyesinde ve kan basıncı seviyesinde azalmaya yardımcı olduğu (Mandel et al, 2005), diyet lifinin kan kolesterol seviyesinde azalmaya yardımcı olduğu ve antihipertansif etkiye sahip olduğu (Whelton et al, 2005), biyoaktif peptitlerin başta kardiyovasküler sisteme olmak üzere pek çok faydası olduğu (Kitts and Weiler, 2003; Korhonen and Pihlanto, 2006; Erdmann et al, 2008) belirtilmiştir.

2.2. Hipertansiyon

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kronik hastalıkları uzun dönemli ve genellikle yavaş ilerleyen hastalıklar olarak tanımlamıştır. WHO' nun verilerine göre kalp-damar hastalıkları, kanser, kronik solunum hastalıkları ve diyabet gibi kronik hastalıklar başlıca ölüm nedenleri arasında yer almakta ve tüm ölümlerin % 60'ını oluşturmaktadır. 2005 yılında kronik hastalıklardan ölen 35 milyon insanın yarısının 70 yaşın altındaki kişilerden oluştuğu belirtilmektedir (http://www.who.int/topics/chronic_diseases/en/).

TC Sağlık Bakanlığı Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nce hazırlanan 16 Şubat 2006 tarihli 'Kronik Hastalıklar Raporu'na göre, ülkemizde yaklaşık 22 milyon kişinin kronik hastalıkların etkisi altında yaşadığı belirtilmektedir. Raporda, kronik hastalıklar grubunda yer alan kalp-damar hastalıkları, hipertansiyon, diyabet ve kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOA) en önemli risk faktörlerinin; sigara ve alkol kullanımı, sağlıksız beslenme, stres ve hareketsiz yaşam tarzı olduğu vurgulanmaktadır. Türkiye'de yaklaşık 15 milyon kişinin hipertansiyon, 4 milyon kişinin de diyabet hastası olduğu belirtilerek, yaklaşık 3 milyon KOA ve 2 milyon koroner kalp hastasının olduğu ifade edilmiştir. TC Sağlık Bakanlığı Türkiye Hastalık Yüğü Çalışması (2004) raporunda da kalp ve damar hastalıklarının 205.457 ölüm ile bütün ölüm nedenleri arasında 1. sırada (%47,7) yer aldığı belirtilmektedir.

Kronik hastalıklar arasında prevalansının yüksekliğiyle dikkati çeken hipertansiyon, mutlaka tedavi edilmesi gereken bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Arıcı ve Çağlar (2002), 20. yüzyılın ilk

yarısının yüksek kan basıncının vücut için gerekli bir adaptasyon mekanizması olduğu ve bu nedenle düşürülmemesi gerektiğinin öne sürüldüğü bir dönemken, yüzyılın ikinci yarısında, özellikle de 1970 sonrasında yapılan çalışmalar yüksek kan basıncının başlı başına bir risk olduğunu ve kontrol edilmesi gerekliliğinin ortaya konduğunu bildirmiştir.

Hipertansiyonun kontrol altına alınmasının önemini gösteren en önemli verilerin, hipertansiyonun oluşturduğu risklere bağlı morbidite ve mortalite rakamlarında antihipertansif tedavi ile gözlenen önemli düşüşlerle elde edildiği belirtilmektedir. Örneğin ABD’ de 1980 yılından sonra daha etkin bir antihipertansif tedavi uygulamasıyla serebrovasküler olaylarda %59, koroner kalp hastalığında %53 azalma olduğu bildirilmiştir (Arıcı ve Çağlar, 2002).

Hipertansiyonun tetiklediği veya yol açtığı sağlık problemleri çok çeşitlidir. Bunlar arasında anjin ve miyokard enfarktüsü, kalp krizi, felç, böbrek yetmezliği, görme kaybı sayılabilir.

Birleşik Ulusal Komite (Joint National Committee, JNC)’nin 2003 yılında hipertansiyonla ilgili olarak yayımladığı raporda, 18 yaş üstü yetişkin bireyler için kan basıncı değerlerine göre tansiyonun derecelendirilmesinde prehipertansiyon kavramı da eklenmiştir. Buna göre oluşturulan yeni sınıflandırma Çizelge 2.1’de görülmektedir.

Çizelge 2.1. Kan basıncının sınıflandırılması (Anonymous, 2003).

Kan basıncı sınıflandırılması	Sistolik kan basıncı (mmHg)	Diyastolik kan basıncı (mmHg)
Normal	<120	ve <80
Prehipertansiyon	120-139	ya da 80-89
Hipertansiyon 1. evre	140-159	ya da 90-99
Hipertansiyon 2. evre	≥ 160	ya da ≥ 100

Hipertansiyonun önlenmesinde ve tedavi edilmesinde çeşitli yöntemler olmakla birlikte sağlıklı yaşam biçiminin benimsenmesi başarıyı getiren en önemli faktördür. Aşırı kilolu ve obez bireylerin kilo vermesi, DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) beslenme planına uygun bir beslenme tarzının benimsenerek sodyum alımının azaltılması ve diyetdeki potasyum/sodyum oranının artırılması, alkol tüketiminin sınırlandırılması ve fiziksel aktivitenin artırılmasının kan basıncını azaltacağı, antihipertansif tedavinin etkinliğini arttıracığı ve kardiyovasküler hastalıkların riskini azaltacağı bildirilmiştir (Anonymous, 2003). Hipertansiyonla mücadelede yapılabilecek yaşam tarzı değişiklikleri Çizelge 2.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Hipertansiyonla mücadele için öneriler† (Anonymous, 2003).

Değişiklik	Öneri	Sistolik kan basıncındaki yaklaşık azalma
Kilo kaybı	Normal vücut ağırlığının korunması (BKİ* : 18.5-24.9 kg/m ²)	5-20 mmHg/10 kg kilo kaybı
DASH beslenme planına uyulması	Meyve-sebzece ve yağsız süt ürünlerince zengin, toplam yağ ve doymuş yağ oranı azaltılmış diyetle beslenme	8-14 mmHg
Diyetteki sodyumun azaltılması	Diyetteki sodyumun günlük 100 mmolden çok olmaması (2.4g sodyum ya da 6g sodyum klorür)	2-8 mmHg
Fiziksel aktivite	Düzenli olarak egzersiz yapmak (haftada birkaç gün en az 30 dk aerobik ya da tempolu yürüyüş)	4-9 mmHg
Alkol tüketiminin sınırlandırılması	Erkekler için günlük en fazla 2 kadeh, kadınlar ve düşük kilolu kişiler için günlük en fazla 1 kadeh	2-4 mmHg

*: BKİ: Beden kitle indeksi; vücut ağırlığı (kg)/boyun karesi (m²)

†: Bu değişikliklerin etkisi uygulama süresine ve doza bağlı olup bazı bireyler için daha etkili olabilir.

2.3. Biyoaktif Peptitler

Fonksiyonel bileşenler içerisinde proteinler ve peptitler son 20 yıldır ayrı bir önem kazanmış ve “gıda kaynaklı biyoaktif peptitler” tanımlaması ile araştırmaların hedeflerinde yer almıştır.

Gıda kaynaklı biyoaktif peptitler terimi, insanlarda yeterli ve dengeli beslenme sağlama özelliklerine ek olarak düzenleyici fonksiyonlara sahip bitkisel veya hayvansal kaynaklı peptitleri tanımlamaktadır. Son 20 yılda biyoaktif peptitler üzerindeki çalışmalar artmıştır. Biyoaktif peptitlerin daha sağlıklı bir beslenmeye katkıda bulunma potansiyeli bilimsel çevrede yaygın şekilde tartışılmıştır. Farklı sağlık etkilerine yol açan biyoaktif peptitlerin tanımlanması için pek çok kimyasal ve biyolojik yöntem geliştirilmiş ve uygulanmış; ancak varsayılan sağlık etkilerinin sadece bir kısmı insan çalışmalarında kanıtlanabilmiştir (Hartmann and Meisel, 2007). Biyoaktif peptitler gıdanın yapısında doğal bir bileşen olarak bulunabilirler ya da asıl protein sekansında inaktif haldeki peptitler enzimatik proteolizle (örneğin gastrointestinal sindirim sırasında veya fermentasyon gibi gıda işleme proseslerinde) açığa çıkabilirler. Ayrıca teknolojik olarak da proteolitik enzimlerle elde edilebilirler. Vücutta serbest kaldıktan sonra düzenleyici görevlerde rol oynarlar (Meisel, 1997; Yust et. al, 2003; Korhonen and Pihlanto, 2006; Hartmann and Meisel, 2007; Wang et. al, 2008).

Biyoaktif peptitlerin canlı organizmada fizyolojik etki gösterebilmesi için öncelikle öncül proteinden salınması ve çevresel organlardaki ya da intestinal sistemde lumen yüzeyindeki hedef bölgeye ulaşması gerekmektedir. Bu peptitler gastrointestinal sistemde bulunan farklı hedef bölgelerde lokal olarak etki edebilir ya da buradan absorplanarak dolaşıma katılabilir ve sistemik etkisini açığa çıkarabilir.

Özellikle immünomodülatör peptitler gibi di- ve tripeptitler ile bazı ADE inhibitörü peptitlerin ince bağırsaklardan yeterli miktarda emilerek periferik hedef bölgelere ulaşabildiği bildirilmiştir (Meisel, 1997; Yust et. al, 2003).

2.3.1. Gıda kaynaklı biyoaktif peptitler

Özellikle süt ürünlerinden olmak üzere biyoaktif potansiyele sahip hayvan ve bitki kökenli pek çok peptit keşfedilmiştir. Süt ürünleri dışında yumurta, et, balık, soya fasulyesi, buğday gibi gıdalardan da biyoaktif peptitler izole edilmiştir (Çizelge 2.3). Bu peptitler oldukça geniş bir alanda etki gösterirler. Bunlar arasında antimikrobiyel etki, kan basıncını azaltıcı etki, kolesterol düşürme özelliği, antitrombotik ve antioksidan aktivite, mineral absorpsiyonu ve biyoyararlılığını artırma, bağışıklık sistemini düzenleyici etki ve opioid özellikler sayılabilir (Hartmann and Meisel, 2007). Biyoaktif peptitlerin etki ettiği sistemler Çizelge 2.4.'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Çeşitli protein kaynaklarından elde edilmiş biyoaktif peptitler (Korhonen and Pihlanto, 2003).

Kaynak	Elde edilmiş yöntemi	Peptit	Fonksiyon
Kazein	Tripsin	Phe-Phe-Val-Ala-Pro	ADE-inhibitörü
	Tripsin- Kimotripsin	Val-Glu-Pro-Ilo-Pro- TyrGly-Leu-Phe	Bağışıklık sistemini düzenleme
	Pepsin	Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu	Antioksidan etki
β - laktoglobulin	Tripsin	Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys	Bakterisid
		Trp-Leu-Ala-His-Lys	ADE-inhibitörü
		Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile- Arg	ADE-inhibitörü
Soya fasulyesi	Proteinaz S	Leu-Leu-Pro-His-His	Antioksidan etki
	Alkalaz	Düşük molekül ağırlıklı peptitler	Antihipertansif
Genetik modifiye soya proteini	Tripsin & Kimotripsin	Arg-Pro-Leu-Lys-Pro-Trp	Antihipertansif
Buğday embriyosu	Alkalın proteaz	Ile-Val-Tyr	ADE-inhibitörü
			Antihipertansif
Pirinç albumini	Tripsin	Gly-Tyr-Pro-Met-Tyr-Pro- Leu-Pro-Arg	Immunostimulasyon
Tavuk	Termolizin	Ile-Lys-Trp	ADE-inhibitörü
		Leu-Lys-Pro	Antihipertansif

Çizelge 2.4. Biyoaktif peptitlerin fizyolojik fonksiyonları (Korhonen and Pihlanto, 2006).

	Kalp-damar sistemi	Sinir sistemi	Gastrointestinal sistem	Bağıışıklık sistemi
Etkin peptit	Antihipertansif	Opioid	Mineral bağlayıcı	Antimikrobiyel
	Antioksidan	i) Agonist	İştah azaltıcı	İmmünomodülatör
	Antitrombotik	ii) Antagonist	Antimikrobiyel	Sitomodülatör
	Hipokolesterolemik			

2.3.1.1. Opioid peptitler

Opioid aktivite gösteren peptitler ilk olarak 1970'lerin sonunda keşfedilmiş ve δ -, μ - ya da κ -tip opioid reseptörlerle etkileşen endojen ligandlarla (endorfinler ve enkefalinler) olan yapısal benzerliklerinden dolayı 'ekzorfınler' olarak isimlendirilmişlerdir (Hartmann and Meisel, 2007). En bilinen ekzojen opioid peptitler, örneğin β -kazomorfınler, μ -tip ligandlar olarak karakterize edilmişlerdir.

Endojen ve ekzojen opioid peptitler arasındaki ortak yapısal özellikler amino ucundaki tirozinin varlığı ve üçüncü ile dördüncü pozisyondaki fenilalanin ve tirozin kalıntılarıdır. Bu, opioid reseptörlere bağlanma bölgesi için önemli bir yapısal özelliktir. Tirozinin fenolik hidroksil grubunun yakınlarında lokalize olmuş negatif potansiyel, opioid aktivite için zorunludur. Tirozinin bulunmayışı biyoaktivitede kaybolmaya yol açar. Tirozin ve fenilalanin yan zincirlerinin doğru bir

şekilde düzenlenmesini sağladığı için prolin varlığı da opioid peptitlerin biyolojik aktivitesi için zorunludur (Meisel, 1997).

2.3.1.2. Mineral bağlayan peptitler

Fosfopeptitlerin çözünür organofosfat tuzları oluşturduğu ve başta kalsiyum olmak üzere farklı mineraller için taşıyıcı olarak görev yaptığı ifade edilmektedir (Meisel, 1997; Hartmann and Meisel, 2007). Bu nedenle ince bağırsakta kalsiyum ve diğer minerallerin emilimi üzerine etkili olmaktadır (Meisel, 1997).

Sütteki fosforun yaklaşık %30'u monoester bağlarıyla kazeinin seril kalıntılarına bağlı halde bulunmaktadır. Kazein, kalsiyum ve fosfat iyonlarının stabilizasyonunda önemli rol oynamaktadır. Kazeinin tiriptik hidrolizi (tripsin enzimi ile hidroliz) sonucu fosforlanmış seril kümeleri içeren kazeinofosfopeptit (KFP) olduğu belirlenmiştir. Bu fosforlanmış seril kümelerinin kazein misellerinin oluşumunu sağlayan kalsiyum fosfat ve kazein arasındaki interaksiyondan sorumlu olduğu bildirilmiştir. KFP'ler kalsiyum ve fosfor minerallerinin biyoyararlılığının artmasını sağlamaktadır. KFPlerin bağırsaktaki kalsiyum absorpsiyonuna etkileri üzerine sığanlarla yapılan denemelerin sonuçları bu peptitlerin ince bağırsaktaki pasif kalsiyum transportunu arttırdığını işaret etmektedir. İnsanlarla yapılan çalışmalar da süt tüketiminden sonra duodenumda ve midede küçük kazein fosfopeptitlerinin varlığını göstermiştir. Ancak insanlarda KFPlerin pasif kalsiyum absorpsiyonunu arttırdığına dair kanıt bulunamamıştır. Bununla birlikte KFP'lerin spontan hidroksiapetit (florapetit) presipitasyonunu önleyebildiği belirtilmiştir. Çalışmalar, kalsiyum ve fosfat iyonlarının dış yüzeyinde stabilize olmasını sağlayan kazein fosfopeptitlerinin, dış minesindeki lezyonların tekrar mineralizasyonunu sağladığını da göstermiştir (Hartmann and Meisel,

2007). KFP'lerin, mineralleri bağlayıp çözünürleştirdikleri için osteoporozun, diş çürüklerinin, aneminin ve hipertansiyonun önlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Bu peptitlerin diş çürüklerini önleyici etkisinin pek çok insan ve hayvan çalışmalarında kanıtlandığına ait bilgiler literatürde bulunmaktadır. KFP'lerin diş yüzeyinde tekrar kalsiyum birikimini teşvik ettiği ve κ -kazeinden elde edilen glikomakropeptidin ağız mukozasında plak oluşturan bakterilerin adhezyonunu ve gelişmesini engellediği belirtilmiştir (Korhonen and Pihlanto, 2006).

2.3.1.3. Bağışıklık sistemini düzenleyici (İmmünomodülatör) peptitler

Bu peptitlerin lenfosit proliferasyonu, doğal öldürücü hücre aktivitesi (naturel killer cell activity), antikor sentezi ve sitokin regülasyonu gibi bağışıklık sistemi fonksiyonlarını güçlendirdiği belirtilmektedir. Dahası bu peptitlerin atopik bireylerde allerjik reaksiyonları azalttığı ve gastrointestinal sistemdeki mukozal bağışıklığı güçlendirdiği bildirilmiştir. Pirinç ve soya fasulyesi proteinlerinin triptik hidrolizatlarından elde edilmiş bağışıklık sistemini düzenleyici peptitlerin, süperoksit anyonlarını uyararak non-spesifik immün savunmasını tetikleyici etki gösterdiği belirtilmiştir (Hartmann and Meisel, 2007).

2.3.1.4. Sitomodülatör peptitler

Sitokimyasal çalışmalar gıda kaynaklı biyoaktif peptitlerin farklı hücre tiplerinin canlılığını (proliferasyon, farklılaşma, apoptosis) düzenlediğini göstermiştir. Bazı süt kaynaklı peptitlerin normal hücrelerde etkili değilken kanser hücrelerinde apoptosisi tetiklediği

gösterilmiştir. Sitomodülatör ve immünomodülatör özelliklerin, gıda kaynaklı biyoaktif peptitlerin tümör gelişiminde koruyucu aktivitesini oluşturmada birlikte etkili oldukları bildirilmiştir (Hartmann and Meisel, 2007).

2.3.1.5. Antitrombotik peptitler

Kan trombosit agregasyonunu ve trombosit yüzey reseptörlerine fibrinojen bağlanmasını inhibe eden peptitler glikomakropeptit sekansıya şifrelenmiştir. Bu peptitler bebek mamalarıyla ya da anne sütüyle beslenen yeni doğmuş bebeklerin kan plazmasında tespit edilmiştir (Hartmann and Meisel, 2007).

2.3.1.6. Antioksidan peptitler

Zorunlu yağ asitlerinin enzimatik veya non-enzimatik peroksidasyonunu engelleyen antioksidan özellikler süt proteinlerinden elde edilen peptitlerde tespit edilmiştir. Bu peptitlerin çoğunun α -kazein sekansıya şifrelendiği belirtilmiştir. His-His dipeptidinin N terminaline lösin ya da prolin eklenmesinin antioksidan aktiviteyi arttırdığı ve BHT, BHA gibi peptit olmayan antioksidanlarla sinerji oluşturduğu belirtilmiştir (Hartmann and Meisel, 2007).

2.3.1.7. Hipokolesterolemik peptitler

Hipokolesterolemik etki kazein ve peynir altı suyu kaynaklı peptitler ve soya proteini kaynaklı peptitler için bildirilmiştir. Olası etki mekanizması β -laktoglobulinin triptik hidrolizatı (LTH) ile beslenen sığırcılarda fekal steroid salgısının fazla olduğunun tespit eden araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür. Bu durum misel yapıdaki

kolesterol çözünürlüğünde LTH indüklü azalmaya ya da daha fazla taurokolat (taurocholate) bağlama kapasitesine bağlanabilmektedir (Hartmann and Meisel, 2007).

2.3.1.8. Antimikrobiyal peptitler

Antimikrobiyal peptitler daha çok peynir altı suyu proteini olan laktoferrinden elde edilmiştir. Bununla birlikte α_{S1} -kazein ve α_{S2} -kazeinden elde edilen yeni antibakterisidal peptitler tanımlanmıştır. Laktoferrinin pepsinle hidrolizinden oluşan peptitlerin bakterisidal özelliklerinin daha fazla olduğu tespit edilmiş ve bu durumun, daha küçük peptitlerin mikrobiyal yüzeydeki hedef bölgelere daha hızlı ulaştığının bir göstergesi olduğu ifade edilmiştir. Antimikrobiyal peptitlerin (laktoferrisin ve sentetik analogları, kazosidin-I gibi) mikroorganizmaların hücre geçirgenliklerini arttırarak etki ettiği belirtilmiştir (Meisel, 1997; Korhonen and Pihlanto, 2006; Hartmann and Meisel, 2007).

2.3.1.9. İştah azaltıcı peptitler

Glikomakropeptitin (GMP) ve kazeinomakropeptitin (KMP) bağırsak fonksiyonlarını düzenleme etkisi üzerine yapılan çalışmalar, yaklaşık on yıllık bir geçmişe dayanmaktadır. KMP'in, gastrik salgıyı engellediği ve midenin hareketlerinin yavaşlamasını sağladığı belirtilmiştir. Ayrıca KMP tokluk hormonu olan kolesistokininin salgılanmasına neden olmaktadır. Bu hormon gıda alımını ve sindirimini düzenlemektedir. Sindirim sırasında midede bütün halde KMP'in varlığı belirlenmiş, diğer taraftan yoğurt ve süt tüketimi sonrası yetişkin bireylerde kan dolaşımında GMP ve/veya KMP'nin varlığı saptanmıştır. Bu çalışmalara dayanarak iştah azaltma ve kilo kontrolü amacıyla, GMP

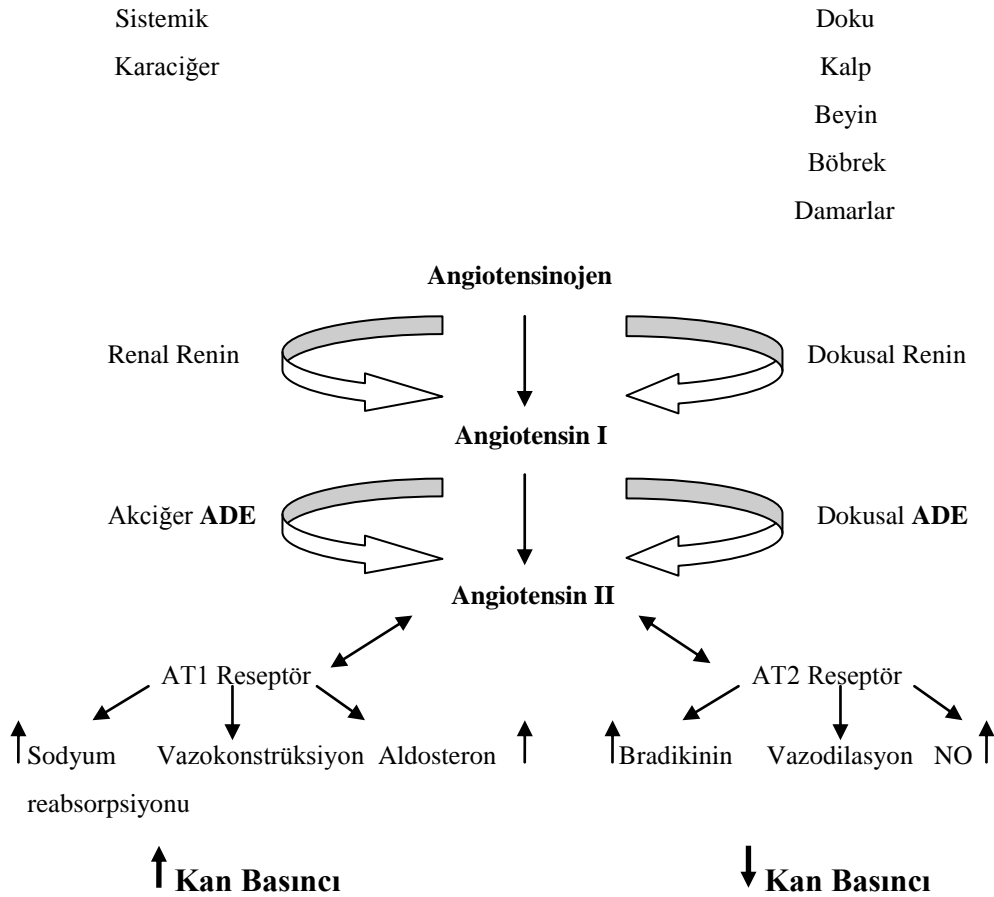
içeren ticari ürünler tasarlanmış ve satışa sunulmuştur. Ancak bu tarz ürünlerin klinik etkilerinin aydınlatılması için daha fazla sayıda çalışmaya gereksinim duyulduğu da önemle vurgulanmıştır (Korhonen and Pihlanto, 2006).

2.3.1.10. Antihipertansif (ADE inhibitörü) peptitler

Anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE, EC. 3.4.15.1) bir dipeptil karboksipeptidazdır ve Renin-Anjiotensin-Aldosteron Sistem (RAAS)' de yer alır. İnsan fizyolojisinde major bir regülatör olan RAAS, kan basıncını, hacmini ve elektrolitleri kontrol etmekte, kalbi, damarları ve böbrekleri etkilemektedir (Keidar et al., 2007).

Angiotensin prosesi, **angiotensinojenin renin** ile hidroliziyle inaktif bir peptit olan **Angiotensin I (Ang. I)** oluşumuyla başlamakta ve **Angiotensin dönüştürücü enzimin (ADE)**, Ang. I' in karboksil ucundaki iki amino asidi ayırması ile **Angiotensin II (Ang. II)** oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Bir oktapeptit olan Angiotensin II potansiyel bir damar daraltıcıdır (vazokonstriktör). Ayrıca bu etkinin yanı sıra ADE, damar rahatlatıcı aktivite gösteren bradikininin de inaktivasyonunu katalizlemektedir. Böylece iki farklı mekanizma yoluyla ADE, kan basıncının artmasına neden olmaktadır (Muguerza et. al, 2006; Theodore and Kristisson, 2007; Shuangquan et. al, 2008). Şekil 2.1'de kan basıncının düzenlenmesi prosesi şematize edilmiştir.

Şekil 2.1. Kan basıncının düzenlenmesinde ADE' nin rolü
(www.nature.com/ajh)



Hipertansiyon tedavisinde ADE inhibisyonu faydalı bir terapötik yaklaşım olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle antihipertansif ilaçların

geliştirilmesinde ADE inhibisyonu hedef olarak belirlenmiştir. Pek çok sentetik ADE inhibitörü sentezlenmiş ve antihipertansif ilaçların yapımında kullanılmıştır (Li et al., 2004).

Kaptopril, enalapril, lizinopril, ramipril hipertansiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılan sentetik ADE inhibitörleridir. Ancak sentetik inhibitörlerin öksürük, tat alma duyusu bozuklukları, kızarıklık, ödem gibi yan etkilere sebep olduğu bilinmektedir (Li et. al, 2005). Bu nedenle ADE inhibitörlerinin doğal kaynağı olan gıdaların belirlenmesi konusuna olan ilgi artmıştır.

ADE inhibitörü peptitler ADE' nin aktivitesini azaltarak tansiyon düşürücü etki gösterirler. Ekzojen ADE inhibitörlerinin ilk olarak yılan zehirinden izole edilmesinden bu yana özellikle süt, et ve balık gibi gıdalardan pek çok sayıda ADE inhibitörü izole edilmiştir. Bu peptitler genellikle kısa zincirli olup prolin gibi polar amino asit kalıntıları içerirler (Korhonen and Pihlanto, 2006; Hartmann and Meisel, 2007).

Gıdalardan izole edilen ADE inhibitörleriyle yapılan çalışmalarda *in vitro* antihipertansif etkinin yanı sıra bu peptitlerce zengin diyetle beslenen spontan hipertansif sığanlarda (SHS) hipertansiyonun baskılandığı gösterilmiştir (Fujita and Yoshikawa, 1999; Sipola et. al, 2002; Seppo et. al, 2003' e atfen Hong et. al, 2008). Ayrıca hipertansif bireylerle yapılan araştırma sonuçlarının da ADE inhibitörü yönünden zengin diyetin antihipertansif etkiye sahip olduğunu gösterdiği belirtilmektedir (FitzGerald and Meisel, 2000' e atfen Hong et. al., 2008).

Gıdaların ADE inhibitörü peptit kaynağı olarak kullanılabilme potansiyelini konu alan çalışmalar süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri, su ürünleri, tahıllar ve baklagiller ve diğer ürün gruplarında yapılan çalışmalar şeklinde sınıflandırılabilir.

2.3.1.10.1. Süt ve süt ürünleri kaynaklı ADE inhibitörü peptitler

Süt ve süt ürünlerinin ADE inhibisyonu aktivitesine ilişkin çalışmalar sütün fermantasyonu üzerine yoğunlaşmıştır. Süt fermantasyonunun ADE inhibitörü peptit oluşumunda çok etkili bir proses olduğu belirtilmektedir (Muguerza et. al., 2006). Fermantasyonda en çok yararlanılan suşların *Lactobacillus helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Saccharomyces cerevisiae* olduğu görülmektedir (Bütikofer et al., 2007; Shuangquan et al., 2008).

Sütün *Lactobacillus helveticus* ile fermantasyonu sonucunda oluşan tripeptitler valil-prolil-prolin (Val-Pro-Pro; VPP) ve izolösil-prolil-prolin (Ile-Pro-Pro; IPP) antihipertansif etkiden sorumlu başlıca biyoaktif peptitler olarak tanımlanmıştır. İsviçre’ de tüketilen 44 peynir çeşidiyle yapılan çalışmada VPP ve IPP miktarlarının sırasıyla 0-224.1 ve 0-95.4 mg/kg aralığında değiştiği belirtilmiştir. Sert peynirlerde bu iki peptidin toplamının 100 mg/kg, yarı sert peynirlerde 51.6 mg/kg ve yumuşak peynirlerde 3.4 mg/kg olduğu tespit edilmiştir. Camambert, Mozzarella gibi pastörize ya da UHT sütle yapılan yumuşak peynirlerde ve Tilsit, Raclette, Edam ve Manchego gibi pastörize sütle yapılan yarı sert peynirlerde oldukça az miktarda VPP ve IPP tespit edildiği bildirilmiştir. Yumuşak peynirlerin aksine daha uzun olgunlaşma periyodu (10 haftadan 18 aya kadar) gerektiren peynirlerde daha fazla VPP ve IPP varlığı saptanmıştır. Bu durumun, prolin içeren bu iki peptidin oluşması için kuvvetli proteoliz gerektiğini işaret ettiği belirtilmiştir. IPP ve VPP içeren fermente süt ürünlerinin tüketildiği kısa ve uzun dönemli insan denemelerinde de kan basıncının azaldığı saptanmıştır (Bütikofer et al., 2007).

Muguerza et al. (2006) çiğ sütün farklı bakteri suşlarıyla fermente edilmesinin *in vitro* ADE inhibisyonu aktivitesi üzerine etkilerini incelemiş ve elde edilen fermente sütlerin entübe edildiği SHS üzerinde kan basıncı değerlerine ilişkin değişimi gözlemlemiştir. Bu çalışmada en yüksek ADE inhibisyonu aktivitesini sağlayan suşun *Enterococcus faecalis* olduğu saptanmıştır. Fermente sütlerin DKB (diastolik kan basıncı) seviyesinde kaptopril ile hemen hemen aynı oranda azalmaya yol açtığı; ancak SKB (sistolik kan basıncı) seviyesinde daha az etkili olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada fermente sütlerin normotensif sığırcılar üzerindeki etkisi de incelenmiş ve ne SKB ne DKB seviyesinde değişim gözlenmiştir. Bu nedenle söz konusu suşla üretilen fermente sütün bir fonksiyonel gıda olarak sunulmasında normotensif bireyler açısından bir sakınca yaratmayacağı yorumu yapılmıştır.

Sütün dört farklı *Enterococcus faecalis* suşuyla fermente edildiği bir çalışmada (Quirós et al., 2007) oluşan peptitler molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlarına ayrılmış ve molekül ağırlığı 3000 Da' dan küçük olan fraksiyonun ADE inhibisyonu aktivitesinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu fraksiyon RP-HPLC ile 10 alt fraksiyona ayrılmış ve her birinin ADE inhibisyonu aktivitesi belirlenmiştir. Bu fraksiyonların kütle spektrometrisiyle tanımlaması yapılmıştır. En aktif alt fraksiyonun β -kazeinin 133-138 fragmanına [β -KN f(133-138)] karşılık geldiği bulunmuştur. Toplam 8 adet peptit sekansı tanımlanmış ve hepsinin β -KN fragmanlarına karşılık geldiği görülmüştür. Hepsinin de hidrofobik karakter gösterdiği ve prolin yönünden zengin olduğu saptanmıştır. En düşük IC_{50} (ADE' nin aktivitesini %50 oranında azaltmak için gerekli olan peptit konsantrasyonu) değerine sahip peptitler olan β -KN f(133-138) ve β -KN f(58-76)' in IC_{50} değerlerinin sırasıyla 5.4 ve 5.3 μ M olduğu belirlenmiştir. Bu iki peptidin SHS üzerindeki etkisi incelenmiş

ve hem SKB hem de DKB seviyelerinde azalmaya yol açtıkları tespit edilmiştir.

Deve sütünün *Lactobacillus helveticus* ile fermantasyonunun da ADE inhibisyonu aktivitesine yol açtığı Shuangquan et al (2008) tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada IC₅₀ değeri 19.9 µM olan Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp nonapeptidi izole edilmiştir. Bu peptidin sığır κ-KN f(107-115)' nin primer yapısında bulunduğu belirtilmektedir. Pepsin, tripsin ve kimotripsin ile hidrolizi sonucunda da aktivitesini neredeyse tamamen koruduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 100 °C'de 20 dak ısıtılma işlemi sonrasında da aktivitesinde kayıp olmadığı, ancak 110 °C'de 60 dak ısıtılma işlemi sonrasında % 50 oranında aktivite kaybı olduğu bildirilmiştir.

Süt ürünlerinin fermente edilmesinin yanı sıra süt proteinlerinin proteolitik enzimlerle hidrolizi de ADE inhibitörü peptit eldesi çalışmalarında denenmiştir. β-Laktoglobulin (β-Lg), α-Laktalbumin (α-La) ve peynir altı suyu protein konsantratinin (PPK) pepsin, tripsin ve kimotripsinle hidrolize edildiği çalışmada (Mullally et al., 1997) elde edilen hidrolizatların ADE inhibisyonu aktivitesinin %84' ten fazla olduğu belirlenmiştir. Hidrolizden önceki aktivitelerinin ise %10' dan daha az olduğu bildirilmiştir. Hidrolizden önce proteinlerin 80°C' de 20 dak ısıtılmasının da ADE inhibisyonu aktivitesinde bir değişikliğe yol açmadığı belirtilmiştir. PPK tripsin hidrolizatının ultrafiltrasyonu sonucu elde edilen 3 kDa molekül ağırlığına sahip permeatın ve 1 kDa molekül ağırlığına sahip permeatın IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 195.1 ve 201.1 mg/L, β-Lg tripsin hidrolizatının ise 3 kDa molekül ağırlığına sahip permeatın ve 1 kDa molekül ağırlığına sahip permeatın IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 130.0 ve 160.4 mg/L olduğu tespit edilmiştir.

β -Lg' in, ticari bir proteaz-peptidaz preparatı olan Protease N Amano ile hidroliz edildiği bir çalışmada, uygulanan sıcaklığın elde edilen peptit tipi ve hidrolizattaki konsantrasyonu üzerinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. 45 ve 55 °C' de uygulanan hidrolizden elde edilen hidrolizatların toplam ADE inhibisyonu aktivitesi birbirinden çok farklı değilken, RP-HPLC ile ayrılan 8 fraksiyonun ADE inhibisyonu aktivitesinin farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu durum, hidroliz aşamasında uygulanan farklı sıcaklıkların farklı peptit çeşitleri oluşumu ve dolayısıyla farklı inhibisyon potansiyeline yol açtığı şeklinde yorumlanmıştır. İki farklı sıcaklıkta uygulanan hidrolizden elde edilen hidrolizatlara ait bazı fraksiyonların ortak peptit sekansına sahip olduğu da görülmüştür. Bu çalışmada molekül ağırlığı 804.5 Da ve IC₅₀ değeri 8µM olan β -Lg f(36-42) peptidi izole edilmiştir (Ortiz-Chao et al., 2009).

da Costa et al. (2007), peynir altı suyu tozu proteini izolatından α -kimotripsin, Alkalaz ve Proteomix ile IC₅₀ değerleri 0.05-0.89 mg/mL arasında değişen hidrolizatlar elde etmiştir. Hidrolizden önce 65°C' de ısıtma işlemi uygulamanın ADE inhibisyonu aktivitesinde artışa yol açtığı belirlenmiştir. En fazla ADE inhibisyonu aktivitesine yol açan enzimin α -kimotripsin olduğu belirtilmiştir. Elde edilen hidrolizatlarla beslenen SHS' larda en fazla kan basıncı düşüşüne yol açan hidrolizatın 65°C' de ısıtma işlemi ardından Alkalaz uygulanmış olan hidrolizat olduğu belirlenmiştir (2 saat sonra 19.1 mm Hg ve 4 saat sonra 14.9 mm Hg azalma). Ayrıca bu hidrolizat damar yoluyla enjekte edildiğinde de 4 saat sonra 24.84 mm Hg ve 6 saat sonra 28.08 mm Hg azalma gözlemlendiği belirtilmiştir.

Süt protein hidrolizatlarının ADE inhibisyonu aktivitesinin incelendiği bir başka çalışmada Otte et al. (2007), kazeinin peynir altı suyu proteininden daha fazla inhibitör peptit oluşumuna olanak

sağladığını tespit etmiştir. Kazein ve peynir altı suyu hidrolizatlarının sırasıyla %85 ve %79 luk inhibisyon sağladığı ve IC₅₀ değerlerinin de sırasıyla 45-83 ve 90-400 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. Kazeinin peynir altı suyundan daha fazla inhibisyona yol açması, prolin yönünden daha zengin olmasına ya da daha esnek bir molekül yapısına sahip olduğu için proteolize daha açık olmasına bağlanmıştır. Hidrolizde kullanılan enzimler ADE inhibitörü peptit verimi açısından en yüksek aktiviteden en düşük aktiviteye göre Termolisin> Proteinaz A> Tripsin> Pepsin> *Bacillus licheniformis* ten elde edilen Proteaz olarak sıralanmıştır. Termolisinin en yüksek ADE inhibisyon aktiviteye sahip peptitleri oluşturması da, bu enzimin ADE ile aktif bölgelerinin benzeşiyor olmasına bağlanmıştır.

İki farklı bebek maması formülasyonunun ADE inhibisyon aktivitesi Hernández-Ledesma et al. (2004) tarafından incelenmiştir. Formülasyonlardan biri süt proteini bazlı (BF1) iken diğeri hidrolize edilmiş peynir altı suyu proteini bazlıdır (BF2). Pepsin ile hidroliz sonrası BF1'in ADE inhibisyonu aktivitesinin artış gösterdiği, pankreatik ekstraktla hidroliz sonrasındaysa değişiklik olmadığı belirlenmiştir. BF2 için ise hidroliz öncesi ve sonrasındaki ADE inhibisyonu aktivite değerlerinin çok yakın olduğu bildirilmiştir. Bu durum, BF1'in yapısındaki proteinlerin gastrointestinal enzimlerin aktivitesiyle, ADE inhibitörü peptit öncüsü olarak davrandığı ve BF2' de ise sindirimden önce halihazırda var olan inhibitör peptitlerin gastrointestinal sistemde dayanıklılık gösterdiği şeklinde açıklanmıştır.

Yoğurdun ADE inhibisyonu aktivitesine ilişkin yapılan bir çalışmada (Donkor et al., 2007). 28 günlük depolama sırasında aktivitenin %70' ten %90'a çıktığı belirlenmiştir. Yoğurt kültürünün (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Lb1466 ve *Streptococcus*

thermophilus St1342) yanı sıra *L. acidophilus* L10, *L. casei* L26 ve *Bifidobacterium lactis* B94 içeren probiyotik yoğurdun IC₅₀ değerinin normal yoğurdunkinden daha düşük olduğu da gösterilmiştir. Bu durum birkaç farklı mikroorganizma çeşidi içeren karışık kültürle üretilen fermente sütlerin tek bir suşla fermente edilenden daha fazla çeşitte fonksiyonel bileşen içerdiği gerçeğine bağlanmıştır. Probiyotik yoğurdun depolanması sürecinde, en aktif peptitlerin birinci günde olduğu görülmüştür. Ancak IC₅₀ değerinin 7. gündeki ani artışı, inhibitör peptitlerin daha fazla hidrolize olarak ADE inhibisyon kapasitesini düşürdüğünü göstermiştir. 7. ve 21. gün arasında ise inaktif peptitlerin proteolitik modifikasyonu ya da kazeinden yeni peptitlerin salınmasıyla IC₅₀ değeri tekrar azalmıştır. 28 günlük depolama sonrasında en fazla inhibisyon gösteren 8 fraksiyon RP-HPLC ile ayrılmış ve IC₅₀ değerlerinin 1.56-12.41 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Bu peptitler arasında VPP ve IPP'nin de olduğu ve IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 2.61 ve 3.77 µg/mL olduğu saptanmıştır.

Koyun yoğurduyla yapılan bir başka çalışmada (Papadimitriou et al., 2007) yoğurt [*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* (1:1) ile] ve probiyotik yoğurdun [*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus* ve *L. paracasei* subsp. *paracasei* (2:2:1)] ADE inhibisyonu aktiviteleri incelenmiştir. 26 günlük depolama süresince yoğurtların suda çözünür ekstraktlarının peptit profilleri RP-HPLC ile incelenmiş ve iki yoğurdun bu bakımdan benzerlik gösterdiği görülmüştür. Çoğunluğu β-kazein kökenli 12 adet peptit tanımlanmıştır. Depolama süresince peptit konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak % ADE inhibisyonu aktivitelerinin artış gösterdiği belirlenmiştir. İki yoğurt arasında ADE inhibisyonu aktivitesi bakımından fark olmadığı görülmüştür. Bu duruma neden olarak her iki yoğurttaki peptit profillerinin benzer olması gösterilmiştir. Probiyotik yoğurdun suda çözünür ekstraktından elde

edilen en aktif peptidin β -KN f(114-121)' e karşılık gelen sekansa sahip olduğu ve IC_{50} değerinin 0.37 mg/mL olduğu belirlenmiştir.

Ünal (2008), kazeinat ve peynir suyu protein konsantresi ile zenginleştirilmiş yoğurtlarla yapmış olduğu çalışmasında ADE inhibisyonu aktivitesi en yüksek yoğurdun %4 oranında peynir suyu protein konsantresi ilaveli yoğurt olduğunu belirtmiştir. Bu yoğurda ait IC_{50} değerinin 0.32 mg protein/mL olduğu saptanmıştır. Bu yoğurdun önemli düzeyde yüksek *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayısı gösterdiği belirtilmiş ve proteolitik aktivite ile ADE inhibisyonu ilişkisine dikkat çekilmiştir.

Çizelge 2.5'te, süt ve süt ürünlerinden elde edilmiş peptitler ve IC_{50} değerleri görülmektedir.

Çizelge 2.5. Bazı süt ürünlerinden elde edilmiş peptitler ve IC_{50} değerleri

Kaynak	Peptit	IC_{50} değeri	Referans
Peynir	VPP-IPP	2.0-29.5 mg peynir/mL	Butikofer et al.,2007
<i>Enterococcus faecalis</i> ile fermente edilmiş süt	-	34-59 μ g protein/mL	Muguerza et al., 2006
<i>Enterococcus faecalis</i> ile fermente edilmiş süt	MA* <3000 Da	28 \pm 2 μ g/mL	Quirós et al., 2007
	β -KN f(133–138)	5.3 μ M	
<i>Lactobacillus helveticus</i> 130B4 ile fermente edilmiş yağsız deve sütü	β -KN f(58–76)	5.4 μ M	Shuangquan et al., 2008
	Ala-Ile-Pro-Pro-Lys- Lys-Asn-Gln-Asp	19.9 μ M	

β -Lg tripsin hidrolizati	MA<3000 Da	130.0 mg/L	Mullally et al., 1997
	MA<1000 Da	160.4 mg/L	
Peynir altı suyu tripsin hidrolizati	MA<3000 Da	195.1 mg/L	
	MA<1000 Da	201.1 mg/L	
β -Lg Protease N Amano hidrolizati	β -Lg f(36-42)	8 μ M	Ortiz-Chao et al., 2009
Peynir altı suyu α -kimotripsin hidrolizati	-	0.005 mg/mL	da Costa et al., 2007
Peynir altı suyu alkalaz hidrolizati		0.68 mg/mL	
Kazeinomakropeptit termolizin hidrolizati	-	477 μ g/mL	Otte et al., 2007
Peynir altı suyu izolatu termolizin hidrolizati		83 μ g/mL	
Yoğurt	β -KN f(74–76)-IPP	3.77 \pm 0.26 μ g/mL (11.6 μ M)	Donkor et al., 2007
	β -KN f(84–86)-VPP	2.61 \pm 0.24 μ g/mL (8.4 μ M)	
	β -KN f(69–73)- Ser-Leu-Pro-Gln-Asn	5.29 \pm 0.55 μ g/mL	
Probiyotik koyun yoğurdu	β -KN f(114-121)	0.37 mg/mL	Papadimitriou et al., 2007
%4 süt tozu ilaveli yoğurt	-	0.54 \pm 0.00 mg/mL	Ünal, 2008
%4 kazeinat ilaveli yoğurt		0.60 \pm 0.21 mg/mL	
%4 peynir suyu protein konsantresi ilaveli yoğurt		0.32 \pm 0.23 mg/mL	

* MA: molekül ağırlığı

2.3.1.10.2. Et ve et ürünleri ile su ürünleri kaynaklı ADE inhibitörü peptitler

Tavuk göğüs etinin antihipertansif etkisinin incelendiği bir çalışmada (Saiga et al., 2003), *Aspergillus'tan* elde edilen proteazla hidrolize edilmiş olan tavuk ekstraktı ile beslenen SHS'ların kan basıncı değerlerinde 2 saat sonra 45 mm Hg'lık bir azalma gözlenmiştir. Hidrolize edilmemiş tavuk ekstraktıyla beslenen sıçanlarda ise 3 saat sonunda kan basıncında 50 mm Hg'lık azalma belirlenmiştir. Hidrolize edilmiş ve edilmemiş ekstraktın IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 1.1 ve 1060 mg olduğu saptanmıştır. Hidrolizden sonra ultrafiltrasyonla iki fraksiyona ayrılan hidrolizattan molekül ağırlığı 1000 Da' dan küçük olan fraksiyonun daha fazla inhibisyon gösterdiği belirtilmiştir.

Theodore ve Kristinsson (2007) kedi balığının farklı hidroliz dereceleri ile elde edilen hidrolizatlarının ADE inhibisyon etkilerinin farklı olmadığını, ancak hidrolizatların önemli derecede inhibisyona neden olduğunu göstermiştir. %5 hidroliz derecesindeki hidrolizatın %90.6'lık inhibisyona, %15 ve %30 hidroliz derecesindeki hidrolizatların ise sırasıyla %70.0 ve 73.9'luk inhibisyona yol açtığı, ve bu hidrolizatlardan elde edilen suda çözünür peptitlerinin inhibisyon değerlerinin ise sırasıyla %75.0, %77.0 ve %89.7 olduğu belirlenmiştir. Suda çözünür peptitlerin hidrolizattan daha fazla inhibisyon aktivitesi göstermesi de küçük molekül ağırlıklı peptitlerin daha etkin olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Alaska morina balığı derisinden elde edilen jelatinin sırayla Alkalaz, Pronaz E ve Kollagenaz ile hidrolize edildiği bir çalışmada 0.9-1.9 kDa molekül ağırlığına sahip peptitlerin ADE inhibisyonuna neden

olduğu gösterilmiştir. IC_{50} değerleri sırasıyla 2.6 ve 17.13 μM olan, Gly-Pro-Leu ve Gly-Pro-Met tripeptitleri izole edilmiştir (Byun ve Kim, 2001).

İstiridye proteininin pepsinle hidrolize edildiği bir çalışmada Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe sekansına sahip nonapeptit izole edilmiştir. Bu peptidin IC_{50} değerinin 66 μM olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada bu peptidin ısıya ve pH'ya karşı dirençli olduğu da bulunmuştur. İstiridye protein hidrolizatının, SHS' larda SKB seviyesinde (hem kısa dönemli hem uzun dönemli çalışmalarda) azalmaya yol açtığı da gösterilmiştir (Wang et al., 2008).

Sardalya balığından izole edilen Val-Tyr sekansına sahip peptidin ADE inhibisyonu etkisinin incelendiği çalışmada (Kawasaki et al., 2000) bu peptit 4 hafta boyunca oral olarak normal değerlerin biraz üzerinde kan basıncı değerlerine sahip ve çok yüksek kan basıncı değerlerine sahip hastalara verilmiş ve her iki grubun da kan basıncı değerlerinde önemli azalma gözlenmiştir. Ayrıca hastalarda, sentetik ADE inhibitörlerinin neden olduğu yan etkilerin gözlenmediği de bildirilmiştir.

Domuz sarkoplazmik ve miyofibriler protein hidrolizatlarının IC_{50} değerlerinin sırasıyla % 5.3 ve % 3.7 mg olduğu belirtilmiştir. Ultrafiltrasyonla 500 Da' dan büyük ve küçük olarak ayrılan fraksiyonların inhibisyon aktivitelerinin miyofibriler protein hidrolizatı için farklı olmadığı da bildirilmiştir. Bu peptitlerin kandaki proteazlara karşı dayanıklı olduğu, 3 saatlik enzim uygulamasına karşın aktivitenin %73.1' ini koruduğu da gösterilmiştir. Miyofibriler hidrolizatın intraperitoneal olarak SHS' lara verilmesinin 2 saat sonra kan basıncı seviyesinde azalmaya yol açtığı da tespit edilmiştir (Saiga et al., 2002).

2.3.1.10.3. Tahıl ve baklagil kaynaklı ADE inhibitörü peptitler

Tahılların ADE inhibisyonu aktivitesini ele alan çalışmalar arasında mısırın çokça incelendiği görülmektedir (Suh et al., 2003; Kim et al., 2004a; Kim et al., 2004b; Randhir et al., 2007).

Mısır gluteninin farklı enzimlerle hidrolizinin incelendiği bir çalışmada (Suh et al., 2003), 4 saatlik hidroliz sonrasındaki IC₅₀ değerlerinin 8 saat sonraki değerlerden daha düşük olduğu saptanmıştır. İncelenen enzimler arasında en yüksek ADE inhibisyonu aktivitesine yol açan enzimin bir endo- ve ekzo- peptidaz karışımı olan Flavourzyme (IC₅₀=0,16 mg protein) olduğu belirlenmiştir.

Mısır gluteninin Flavourzyme ile hidrolizinden sonra ultrafiltrasyon membranlarıyla fraksiyonlara ayrılmasının ADE inhibitörü peptit eldesinde veri artışına neden olduğu belirtilmiştir (Kim et al., 2004a). Hidrolizat ve ultrafiltrasyon fraksiyonları için elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Mısır gluteni fraksiyonlarının IC₅₀ değerleri (Kim et al., 2004a).

Fraksiyon	IC ₅₀ (mg protein)	
Hidrolizat	-	0.18
Ultrafiltrasyon fraksiyonları	< 5 kDa	0.05
	5-10 Da	12.32
	>10 kDa	207.33

del Castillo et al. (2007) glutenin ve gluten-glukoz model sisteminde elde edilen Maillard reaksiyon ürünlerinin ADE inhibisyon aktivitesini araştırmışlar ve 120 ile 150 °C' de ısıl işlem uygulanan örneklerin IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 1.39 ve 1.56 mg/mL olduğunu belirlemişlerdir. Gluten-glukoz model sisteminde IC₅₀ değerlerinin Maillard reaksiyonunun ilerlemesiyle arttığı saptanmıştır. 3000 Da' dan büyük olan fraksiyonun IC₅₀ değerinin de yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Glutenin papain hidrolizatının tripsin ve kimotripsin hidrolizatından daha fazla ADE inhibisyonu aktivitesi gösterdiği Saiga et al.(2002) tarafından tespit edilmiştir. Bu enzimler için IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 3.9, 31.2 ve 41.8 mg/100g olduğu belirtilmiştir. Gluten hidrolizatlarının kan proteazları ile 37 °C' de 3 saat inkübe edilmesi sonucunda aktivitesinin % 91.4' ünü koruduğu bulunmuştur.

Sorgum tanelerinden ana depo proteini α -kafirinin izole edildiği bir çalışmada (Kamath et al., 2007), kimotripsin hidrolizatları Sephadex G-25 kolonunda dört fraksiyona ayrılmış ve bu fraksiyonların IC₅₀ değerlerinin 1.3 ile 24.3 μ g/mL arasında olduğu belirlenmiştir.

Mung fasulyesi ve pirincin Alkalaz ile hidrolizinden sonraki ADE inhibisyonu aktivitesinin hidroliz öncesi değerlerine göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Mung fasulyesinin ADE inhibisyonu aktivitesi %2.49 dan %76.42 ye, pirincin ADE inhibisyonu aktivitesi ise %1.76 dan %93.27 ye çıkmıştır. Hidroliz sonrası elde edilen hidrolizatların IC₅₀ değerlerinin sırasıyla mung fasulyesi ve pirinç için 0.621 ve 0.139 mg/mL olduğu saptanmıştır (Li et al., 2005).

Nohut depo proteini leguminin Alkalaz ile hidrolizinden IC₅₀ değeri 0.18 mg/mL olan hidrolizat elde edilmiş ve bu hidrolizat da IC₅₀ değerleri

0.011 ile 0.021 mg/ml arasında değişen 6 fraksiyona ayrılmıştır. İnhibitör etki gösteren bu 6 peptidin de metiyonin içerdiği ve diğer hidrofobik aminoasitlerce de zengin olduğu belirlenmiştir (Yust et al., 2003).

Soya proteini hidrolizatının sıcaklık, pH gibi proses parametrelerine ve gastrointestinal proteazlara karşı stabilitesinin incelendiği bir çalışmada (Wu and Ding, 2002), ADE inhibisyonu aktivitesi gösteren peptitlerin farklı sıcaklık ve pH değerlerine oldukça dirençli olduğu belirlenmiştir. Enzim uygulamasından önceki IC₅₀ değeri 0.065 mg/mL iken, pepsin ve pankreatin uygulamasından sonra sırasıyla 0.066 ve 0.073 mg/mL olduğu saptanmıştır. ADE inhibisyonundan sorumlu, sekansı Asp-Leu-Pro ve Asp-Gly olan iki peptit izole edilmiştir.

Vermeirssen et al. (2004), bezelyenin *in vitro* sindiriminin ADE inhibisyonunda artışa neden olduğunu göstermiştir. Sindirim öncesindeki IC₅₀ değerinin 18 mg/mL olduğu, mide ve ince bağırsak sindiriminden sonra bu değerin sırasıyla 0.117 ve 0.076 mg/mL ye düştüğü belirtilmiştir. Bu çalışmayı takip eden çalışmada ise bezelyeden elde edilen hidrolizatın SHS' ların kan basıncı değerlerinde 44.4 mmHg lık (%32 lik) bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Vermeirssen et al., 2005).

Çiğ ve kavrulmuş yer fıstığının enzimatik hidrolizinin ADE inhibisyonu aktivitesine etkisinin incelendiği bir çalışmada (Quist et al., 2009), çiğ fıstığın hidrolizden sonra RP-HPLC ile ayrılan fraksiyonlarının kavrulmuş fıstığa ait fraksiyonlardan daha fazla ADE inhibisyonu aktivitesine yol açtığı tespit edilmiştir. Pepsin-pankreatin ile hidrolizinden sonra RP-HPLC ile elde edilen fraksiyonların çiğ ve kavrulmuş yer fıstığı için IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 7.9- 65.9 µg/mL arasında ve 11-36 µg/mL arasında değiştii belirlenmiştir.

2.3.1.10.4. Diğer gıda kaynaklı ADE inhibitörü peptitler

Yang et al. (2004), ıspanak yapraklarının pepsin ve pepsin/pankreatin hidrolizinin IC₅₀ değeri sırasıyla 56 ve 120 µg/mL olan hidrolizatların elde edilmesiyle sonuçlandığını göstermiştir. Her iki hidrolizatın da SHS üzerinde antihipertansif etkiye sebep olduğu belirtilmiştir.

Yenilebilir mantar *Tricholoma giganteum*dan ADE inhibitörü peptit eldesinin araştırıldığı bir çalışmada sulu ekstraktın (30°C de 3 saat ekstraksiyon) IC₅₀ değerinin 0.31 mg olduğu belirlenmiştir. Saflaştırma basamaklarının ardından sekansı Gly-Glu-Pro ve IC₅₀ değeri 0.04 mg olan bir tripeptit izole edilmiştir. Bu peptidin pepsin ve tripsin uygulamasından sonra aktivitesini sırasıyla %98.5 ve %89 oranında koruduğu bildirilmiştir. SHS üzerinde antihipertansif etkiye sahip olduğu ve kan basıncı değerini 193 mmHg dan 157 mmHg ya düşürdüğü tespit edilmiştir. Aynı dozda kaptopiril uygulamasıyla kan basıncı değerinin 190 mmHg dan 163 mmHg ya indiği belirtilmiştir (Lee et al., 2004).

Brokolinin sulu ekstraktının %76.9 oranında ADE inhibisyonu gösterdiği Lee et al. (2006) tarafından belirtilmiştir. IC₅₀ değeri 10.5 µg/mL olan Tyr-Pro-Lys tripeptidi izole edilmiştir.

Yumurta akının pepsinle hidrolizinin yüksek ADE inhibisyonu aktivitesine sebep olduğu Miguel et al. (2007) tarafından *in vitro* ve *in vivo* denemelerle belirlenmiştir. *In vitro* gastrointestinal sindirim sonrasında aktivitede azalma olduğu saptanmış olmasına rağmen, elde edilen IC₅₀ değerlerinin yine de yüksek bir inhibisyon potansiyeline işaret ettiği belirtilmiştir. *In vitro* sindirimi takiben yumurta akı hidrolizatının ve bunun ultrafiltrasyonla ayrılmış olan 3000 Da' dan küçük fraksiyonunun IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 44.00±1.18 µg/mL den

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hammadde

Çalışmada materyal olarak İzmir'deki bir süpermarketten sağlanan 3 farklı markaya ait kuru fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) , kuru barbunya (*Phaseolus vulgaris* L.) ve yeşil mercimek (*Lens culinaris*) kendi içinde paçallanarak kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Proteinleri çöktürmede kullanılan amonyum sülfat, mikrobiyal gelişimin izlendiği besiyeri Plate Count Agar (PCA) ve etil asetat Merck, Darmstadt, Almanya' dan satın alınmıştır. Proteinlerin enzimatik hidrolizinde kullanılan ticari bir proteaz karışım olan Pronase E (Fluka-81748); Tris-HCl tamponunun hazırlanmasında kullanılan Trizma Hydrochloride (T3253) ve Tris (Cat.: 25,285-9); *in vitro* sindirimde kullanılan pepsin (P7000), PIPES [piperazin-NN'-bis(2-ethan-sulfonik asit)] disodyum tuzu (P3768), pankreatin (P1750), safra ekstraktı (B8631); ADE (Angiotensin converting enzyme from rabbit lung, A6778); N-Hippuryl-His-Leu hydrate (H1635); hemoglobin (H2625); fosfat tamponunun hazırlanmasında kullanılan phosphate buffered saline (P4417); Coomassie blue G (B0770) Sigma-Aldrich firmasından, sodyum borat tamponu (82633) ve sodyum klorür (71378) Fluka' dan, % 85 lik fosforik asit Riedel de Haën firmasından, etanol ise Carlo Erba Reagents' dan alınmıştır. *În vitro* sindirim analizinde ve diyalizde kullanılan Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO:6-8000, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, USA' dan, proteinlerin enzimatik hidrolizinden sonra ultrafiltrasyonla fraksiyonlara ayrılması için

kullanılan Vivaspin 6 model MWCO 3000 ve MWCO 5000 ultrafiltrasyon membranları Sartorius Stedim Biotech GmbH' den alınmıştır. Analizlerde kullanılan deiyonize su Ege Üniversitesi ARGEFAR' dan tedarik edilmiştir. Diğer tüm kimyasal malzemeler analitik saflıkta temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

Kjeldahl Cihazı: Ham örneklerin protein tayinleri Gerhardt Kjeldatherm marka ön yakma ünitesi ve Gerhardt Vapodest 20 marka destilasyon ünitesinden oluşan düzeneğe kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Laboratuvar Değirmeni: Örneklerin öğütülmesi için Brook Crompton Series 2000 laboratuvar değirmeni kullanılmıştır.

pH-metre: Tampon çözeltilerin hazırlanmasında, protein ekstraktlarının hazırlanması ve uygun analiz ortamının sağlanması için gerekli olan pH ayarlama işlemlerinde Sartorius PB-11 pH-metre kullanılmıştır.

Manyetik Karıştırıcı: Çözeltilerin hazırlanması, homojen karıştırma sağlanması ve diyaliz işleminin gerçekleştirilmesi sırasında Stuart heat-stir CC162 manyetik karıştırıcıdan yararlanılmıştır.

Santrifüj Cihazı: Protein ekstraktı eldesinde, enzimatik hidroliz sonrası hidrolizatın ultrafiltrasyonla farksiyonlara ayrılması işleminde ve faz ayrımının gerekli olduğu tüm işlem basamaklarında soğutmalı santrifüj cihazı Thermo Scientific IEC CL31R Multispeed Centrifuge kullanılmıştır.

Hassas Terazi: Tüm tartım işlemlerinde Denver Instrument, SI-234 terazi kullanılmıştır.

Tüp Karıştırıcı: ADE inhibisyonu aktivitesi analizinde etil asetatla ekstraksiyon aşamasında gerekli olan kuvvetli karıştırma işlemi Nüve NM110 tüp karıştırıcı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Su Banyosu: ADE inhibisyonu aktivitesi analizinin uygun sıcaklıkta gerçekleştirilmesinde ve *in vitro* sindirim analizinde gerekli olan çalkalamalı inkübasyonun sağlanmasında Clifton 6F3A marka çalkalamalı su banyosundan yararlanılmıştır.

İnkübatör: Enzimatik hidroliz Dedeoğlu marka inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

Otoklav: Hammaddelere ısı işlem uygulanması amacıyla Hirayama Autoclave, HA-300M (Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan) kullanılmıştır.

Spektrofotometre: ADE inhibisyonu aktivitesi analizinde protein tayininde gerekli spektrofotometrik ölçümler Varian Cary 50, UV-Visible Spectrophotometer ile yapılmıştır.

Derin Dondurucu: -20°C' de saklanması gereken enzim ve substratların ve hemen analize alınmayacak örneklerin depolanmasında Sanyo Medical Freezer kullanılmıştır.

El Blendırı: Pişmiş örneklerin homojenize edilmesinde Arçelik El Blendırı K-1253 kullanılmıştır.

Buzdolabı: Uzun süre depolanmayacak örneklerin +4°C' de saklanması için ve diyaliz işleminin +4°C' de gerçekleştirilmesi için Arçelik marka buzdolabı kullanılmıştır.

3.2.2. Analizler

Tüm denemeler 3 tekrar, 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Hammadde Protein İçeriklerinin Belirlenmesi:

Hammadde protein içerikleri Kjeldahl Metoduyla belirlenmiştir (AOAC, 1990).

0.001 g hassasiyetle 1' er g örnek Kjeldahl tüplerine tartılmış ve üzerlerine yaklaşık 1.5 spatül katalizör (1 kg susuz Na₂SO₄, 30 g Cu₂SO₄.5H₂O, 15 g saf selenyum bileşiminde) eklenerek 14 mL derişik H₂SO₄ ilave edilmiştir. Yakma ünitesinde 480 °C' de 2.5 saat süresince (berrak yeşil renk oluşana dek) yakılmıştır.

Tüplerdeki örnekler üzerine 50 mL saf su eklenmiş ve destilasyon ünitesindeki yerine yerleştirilmiştir. 50 ml % 40'lık NaOH, alkali pompası ile tüp içine pompalandıktan sonra buhar açılıp 6 dakika süresince oluşan destilat (yeşil renkli) 25 ml borik asit içerisinde toplanmıştır.

Destilat, faktörü bilinen 0.1 N HCl çözeltisi ile yeşil renk açık pembeye dönene dek titre edilmiştir.

Protein miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Protein} = \frac{(S - S_{\text{kör}}) \times F \times 0.0014 \times 6.25}{\text{Örnek miktarı (g)}} \times 100$$

F: HCl çözeltisinin faktörü

S: titrasyonda harcanan asit hacmi (mL)

$S_{\text{kör}}$ = deşik sülfirik aside ait düzeltme faktörü

3.2.2.2. Ham Protein Ekstraktı Eldesi:

Kuru baklagil örnekleri öncelikle laboratuvar değirmeninde 60-mesh boyutunda öğütülmüştür. Öğütülmüş örnek 9 hacim deiyonize suyla homojenize edilmiş ve 1 M NaOH ile pH 11'e ayarlanarak proteinler çözünür forma getirilmiştir. 10000xg 20 dak (4 °C) santrifüj işlemiyle çözünmeyen katı partiküller ayrılmıştır.

Proteinleri çöktürmek için uygulanabilecek yöntemler arasından hangi yöntemin kullanılacağına yapılan ön denemeler sonucunda karar verilmiştir. Bunun için izoelektrik çöktürme, nötral tuzlarla çöktürme ve her iki yöntemin bir arada uygulanması denenmiştir.

İzoelektrik Çöktürme: Protein molekülünün yüzeyi hem pozitif hem negatif yüklerle kaplıdır. Her proteinin kendisine özgü olan izoelektrik noktasının (pI) üzerindeki pH değerlerinde, yüzey baskın olarak negatif yükü yüküdür ve negatif yüklü gruplar birbirini iterler.

pI' nın altındaki pH değerlerinde ise yüzey pozitif yüklenir ve yine yüklü gruplar birbirini iterler. pI civarında negatif ve pozitif yükler birbirine eşittir ve zıt yükler birbirini çeker. Bu noktada moleküllerin birbirine uyguladığı elektrostatik çekim sonucunda presipitat oluşur (Harris and Angal, 1995). Öncelikle supernatantın pH'sı, örneğin izoelektrik noktasına (Çizelge 3.1) 1 M HCl kullanılarak ayarlanmıştır. Bu işlem sırasında manyetik karıştırıcı ile devamlı hafif şiddette bir karıştırma sağlanmıştır. Daha sonra karışım 10000xg 20 dak (4 °C) santrifüj edilerek supernatant ve pelet ayrılmış ve pelet 50 mM fosfat tamponunda (pH=7.0) çözülmüştür.

Çizelge 3.1. Kuru baklagil örneklerinin izoelektrik noktaları (Makri and Doxastakis, 2007; Hoch et al, 1999).

Kuru fasulye	Kuru barbunya	Yeşil mercimek
pI= 4.5	pI=4.5	pI=4.8

İyonik şiddeti artırarak çöktürme (Nötral tuzlarla çöktürme): Bu yöntem proteinin yüzey hidrofobitesine bağlıdır. Hidrofobik gruplar baskın olarak protein molekülünün iç yüzeyinde yerleşmiştir; fakat bir kısmı yüzeyde gruplar halinde yer alır. Sisteme tuz eklendiğinde su molekülleri tuz iyonlarını çözer ve su molekülleri protein moleküllerinden uzaklaşır. Böylece hidrofobik bölgeler açığa çıkar. Bir moleküldeki hidrofobik bölge diğer moleküldeki hidrofobik bölge ile etkileşime girer ve agregasyon oluşur. En yaygın kullanılan tuz amonyum sülfattır. Amonyum sülfatın hangi konsantrasyonda kullanılacağı proteinin özelliklerine bağlıdır. İstenen doyumluğa ulaşmak için çözeltiliye eklenmesi gereken amonyum sülfat miktarı ilgili tablolardan (Ek 1) yararlanarak bulunabilir. Kurubaklagiller için genellikle kullanılan %80-90 doyumluk değeridir (Arcan ve

Yemenicioğlu,2007). Supernatantın hacmi ölçölerek %90 amonyum sülfat doygunluğu için gereken miktar tablodan saptanmıştır. Supernatantı içeren beher, buzlu su dolu bir kaba konmuş ve kap manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Amonyum sülfat yavaş yavaş karışıma eklenmiştir. 1 saat boyunca 4 °C' de karıştırılmıştır. Karışım 10000xg 20 dak (4 °C) santrifüjlenmiş ve elde edilen pelet 50 mM fosfat tamponunda (pH=7.0) çözülmüştür (Roe, 2001).

İzoelektrik çöktürme ve iyonik şiddeti arttırarak çöktürme yöntemlerinin birlikte uygulanması: İki çöktürme yöntemi farklı noktaya dayandığı için bu iki yöntem kombine edilerek verim arttırılabilmektedir (Harris and Angal, 1995). Bu nedenle çöktürme aşamasında iki yöntemin beraber uygulanması denenmiştir. Öncelikle supernatantın pH' sı örneğin izoelektrik noktasına ayarlanmış ve karışımı %90 doygunluğa getirecek miktarda amonyum sülfat eklenmiştir. 4 °C' de 1 saat boyunca karıştırmaya devam edilmiştir. Süre sonunda karışım 10000xg 20 dak (4 °C) santrifüjlenmiş ve elde edilen pelet 50 mM fosfat tamponunda (pH=7.0) çözülmüştür.

Çözündürölmüş peletten tuzun uzaklaştırılması (Desalting): Amonyum sülfat ile çöktürölmüş pelet daha sonra tampon çözeltide tekrar çözöndüröldüğu zaman amonyum sülfat kalıntısı içerir. Bu kalıntı protein tayini gibi daha ileriki basamaklarda problem yaratacağı için ortandan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için en çok kullanılan yöntem diyalizdir. Protein çözeltisi, belli büyüklükte moleküllerin geçişine izin veren yarı geçirgen bir membran içine yerleştirilir. Membran uygun bir tampon çözelti ya da saf su içine konarak, membran içindeki küçük moleküllerin osmotik basınç farkından dolayı diyaliz ortamına geçmesi sağlanır. Membranın geçişine izin vermediği daha büyük moleküller ise membran içinde kalır. Membranın gözenek

büyüklüğü hangi molekül ağırlığına sahip molekülleri geçireceğini belirler ve NMWC (nominal molecular weight cutoff) ya da MWCO (molecular weight cut off) ile gösterilir (Harris and Angal, 1995). Bu çalışmada amonyum sülfatın uzaklaştırılması için çözelti MWCO 8000 membran içine doldurulmuş ve membran saf su dolu beher içine yerleştirilmiştir. Beher manyetik karıştırıcı üzerine konmuş ve düzenek buzdolabına yerleştirilmiştir. 4 °C’ de 24 saat diyaliz edilmiştir. Elde edilen diyalizat hemen analize alınmayacaksa -40 °C’ de saklanmıştır.

Üç çöktürme yönteminden elde edilen protein ekstraktında protein tayini yapılmış ve en fazla proteinin kombine yöntemde elde edildiği belirlendiği için, çalışma boyunca protein ekstraktı eldesi kombine yöntem uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

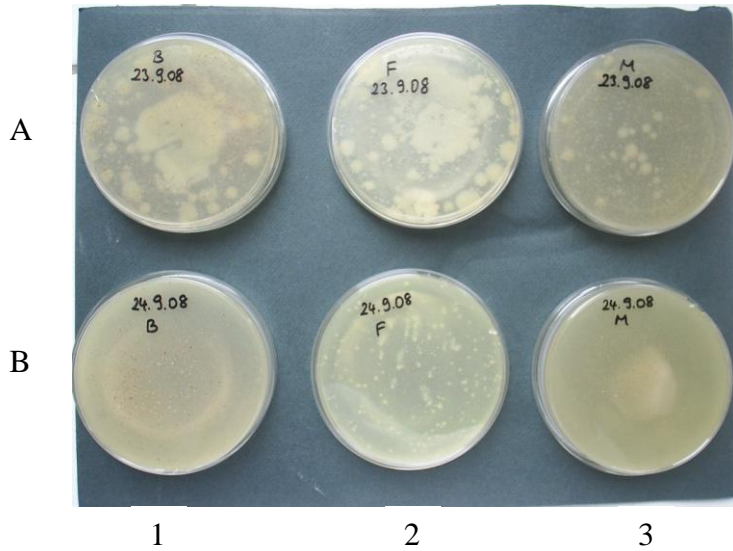
2.2.2.3. Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi:

Proteinlerin enzimatik hidrolizi del Castillo et al. (2007) tarafından önerilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. 1 g örnek üzerine 7 ml 20 mM Tris-HCl tamponu (0,75 U/mL Pronase E içeren pH=8.0) eklenmiştir. Ayrıca mikrobiyal gelişimin önlenmesi için % 0,05 oranında potasyum sorbat ilave edilmiştir. Karışım kuvvetlice çalkalandıktan sonra 37 °C’ de 40 s. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonun bitirilmesi için tüpler buzlu su banyosuna daldırılmıştır. Tüpler daha sonra 10000xg 10 dak santrifüjlenmiştir. Elde edilen supernatant protein hidrolizatı olarak kodlanmıştır.

3.2.2.4. Enzimatik Hidroliz Sırasında Mikrobiyal Gelişimin İzlenmesi:

Çalışılan hammaddelerin belli bir başlangıç mikrobiyal yükü vardır. Enzimatik hidroliz sırasında bu yükün artmaması ve mikrobiyal

gelişimin olmaması istenmektedir. Proteinlerin enzimatik hidrolizi sırasında mikrobiyal gelişim olması, proteolitik aktiviteye yol açacağı için istenmeyen yeni peptitlerin oluşumuna neden olabilecektir. İnkübasyon sırasında mikrobiyal kontaminasyon olup olmadığı, dökme plak yöntemiyle PCA kullanılarak izlenmiştir. Bunun için inkübasyonun başlangıç anında ve 24 saat sonra ekim yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Enzimatik hidroliz sırasındaki ekim sonuçları A: enzimatik hidroliz öncesindeki ekim sonuçları, B: enzimatik hidrolizin 24. saatindeki ekim sonuçları; 1: Barbunyaya ait sonuçlar, 2: Fasulyeye ait sonuçlar, 3: Mercimeğe ait sonuçlar.

Şekil 3.1' den görüldüğü gibi, potasyum sorbat ilavesiyle, mikrobiyal üreme baskılanmış ve mikrobiyal üremeye bağlı gerçekleşebilecek peptit oluşumu engellenmiştir.

3.2.2.5. Protein Hidrolizatlarının Fraksiyonlara Ayrılması:

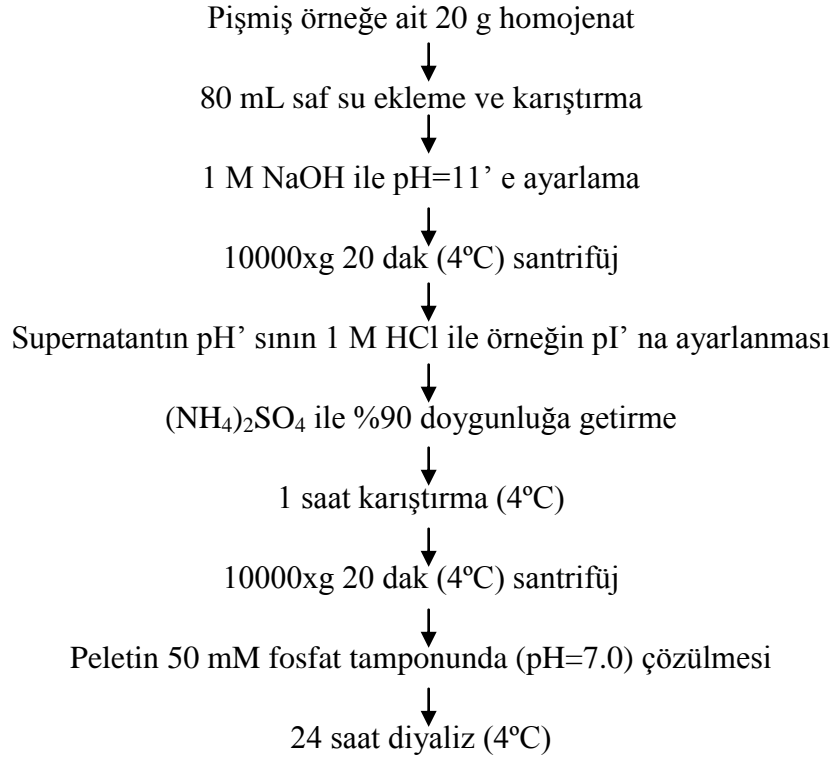
Enzimatik hidrolizden elde edilen protein hidrolizatı 3000 MWCO membran kullanılarak 4°C’ de 7500xg 90 dak santrifüj edilmiş ve molekül ağırlığı 3000 Da’ dan küçük ve büyük olmak üzere 2 fraksiyon elde edilmiştir. Retentat 5000 MWCO membran kullanılarak 4°C’ de 7500xg 20 dak santrifüjlenmiş ve filtratta molekül ağırlığı 3000 ile 5000 Da arası olan ve retentatta molekül ağırlığı 5000 Da’ dan büyük olan fraksiyonlar elde edilmiştir. Fraksiyonlar hemen analize alınmayacaksa -40°C’ de saklanmıştır.

3.2.2.6. Isıl İşlem Uygulaması:

Bütün haldeki kuru baklagil taneleri 1:3 (w/v) oranında distile suyla birlikte 15 dak, 30 dak ve 50 dak boyunca 121.1 °C’ de otoklavlanmıştır.

3.2.2.7. Isıl İşlem Uygulanmış Kuru Baklagillerden Protein Ekstraktı Eldesi:

Isıl işlem uygulanmış örnekler el blendırı yardımıyla homojenize edilmiştir. Bu homojenattan proteinlerin ekstrakte edilmesinde ham örneklerde kullanılan ve daha önce bahsedilen kombine yöntem prosedürü izlenmiştir. Bu prosedür Şekil 3.2’ de özetlenmiştir.



Şekil 3.2. Isıl işlem uygulanmış örneklerden protein ekstraktı elde etme yöntemi

Diyaliz sonrası bulanıklık oluşmuşsa 10000xg 10 dak (4°C) santrifüj edilerek çözünmeyen kısımlar (denatüre protein vb.) uzaklaştırılmıştır.

3.2.2.8. in vitro Sindirim:

İnsandaki sindirim prosesinin modellenmesi için Gil-Izquierdo et al. (2002)' un yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. Isıl işlem uygulanmış örneklere ait homojenattan 10 g alınarak 20 mL saf su ilave

edilmiş ve 1 M HCl kullanılarak karışımın pH sı 2'ye ayarlanmıştır. 1 mL pepsin çözeltisi (4 g pepsin/100 mL 0.1 N HCl) eklenmiş ve çalkalamalı su banyosunda (200 rpm) 37°C' de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra reaksiyonun sonlandırılması için 5 mL 1 M NaOH eklenmiştir. Karışım santrifüj edilerek partiküllerden arındırılmış ve daha sonra 5000 MWCO membran kullanılarak sindirim enzimlerinin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Mide diyalizatını oluşturan filtrat ayrılmıştır.

Bağırsak diyalizatının elde edilmesi için mide sindirimi aynen uygulanmış ve 37°C' deki inkübasyondan sonra ortama 20 mL (0.15 N) PIPES tamponu içeren diyaliz torbası yerleştirilmiştir. İnkübasyona yarım saat daha devam edilmiş, süre sonunda 5 mL pankreatin/safra karışımı (0.5 g pankreatin+3 g safra ekstraktı/250 mL 1 N NaHCO₃) eklenmiştir. 37°C' de 2 saat daha inkübe edildikten sonrasında reaksiyonun sonlandırılması için tüpler kaynar su banyosunda 10 dak bekletilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra diyaliz torbaları çıkarılmış ve saf suyla yıkanmıştır. Diyalizat, sindirim enzimlerinin uzaklaştırılması için 5000 MWCO membrandan geçirilmiştir.

Hemen analize alınmayacak olan mide ve ince bağırsak diyalizatları -40°C' de saklanmıştır.

3.2.2.9. ADE İnhibisyonu Aktivitesinin Belirlenmesi:

Örneklerin ADE inhibisyonu aktivitesi Theodore and Kristinsson (2007) ve del Castillo et al. (2007) tarafından önerilen yöntem ufak bir modifikasyonla uygulanmıştır.

ADE reaktifi: 25 mU/mL konsantrasyonunda ADE çözeltisi hazırlanmıştır.

Substrat: 5mM Hip-His-Leu ve 0,3M NaCl, 50 mM sodyumborat içinde çözülüp 1 M NaOH ile pH' sı 8,3' e getirilerek hazırlanmıştır.

Analiz dörtlü deney tüpü düzeneğine göre gerçekleştirilmiştir.

1. tüp: 100 µL ADE + 40 µL deiyonize su
2. tüp: 140 µL deiyonize su
3. tüp: 100 µL ADE + 40 µL izolat
4. tüp: 40 µL izolat + 100 µL deiyonize su

Hazırlanan deney tüpleri 37 °C' de 5 dak. inkübe edildikten sonra üzerlerine 100 µL substrat çözeltisi eklenmiştir. Aynı sıcaklıkta 30 dak daha inkübasyona devam edilmiştir. Süre sonunda reaksiyonun sonlandırılması için 150 µL 1 M HCl deney tüplerine eklenmiştir.

Tüplere 1000 µL etil asetat ilave edilmiş ve tüpler vortexlenmiştir. Tüp içerikleri 1500xg 15 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra supernatantlardan 750 µL alınarak temiz cam beherlere konmuştur. Beherler kaynar su banyosuna yerleştirilmiş ve etil asetat uçurulmuştur (yaklaşık 15 dak). Etil asetatın uzaklaştırılmasından sonra tüplerde kalan katı Hipurik asit 2 mL deiyonize suyla çözülmüş ve 228 nm' de absorbansı ölçülmüştür. % ADE inhibisyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{ADE İnhibisyonu (\%)} = 100 - \{100 \times (C - D) / (A - B)\}$$

A = ADE + deiyonize suyun absorbanası

B = deiyonize suyun absorbanası

C = ADE + izolatin absorbanası

D = deiyonize su + izolatin absorbanası

İnhibisyon aktivitesi %50' den fazla bulunan örneklerde uygun dilüsyonlar hazırlanarak farklı protein konsantrasyonlarında inhibisyon aktivitesi ölçülmüştür. GraphPad Prism Version 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) paket programı ile örneklere ait IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamanın temeli doz-inhibisyon eğrisi oluşturularak ADE'in aktivitesini %50 oranında azaltmak için gerekli olan örnek konsantrasyonunun belirlenmesine dayanmaktadır. Örnek konsantrasyonunun logaritma değerine karşılık % ADE inhibisyonu grafiğe yerleştirilir. Aşağıdaki 4 parametrelili denklemin çözümlenmesi ile IC₅₀ değeri hesaplanır. Ek 2' de IC₅₀ değerinin hesaplanmasına ait bir örnek verilmiştir.

$$y = \min + \frac{\text{mak} - \min}{1 + 10^{(x - \log \text{IC}_{50})}}$$

y= % ADE inhibisyonu aktivitesi

x= örnek konsantrasyonunun logaritması

mak= inhibisyon aktivitesinin %100 olduğu doğrusal seviye

min= inhibisyon aktivitesinin sıfır olduğu plato

Burada dikkat edilmesi gereken nokta, denklemde yer alan IC₅₀ değerinin, enzimin aktivitesini %50 oranında azaltmak için gerekli olan değerle birebir örtüşmeyebileceği gerçeğidir. Buradaki IC₅₀ değeri, mak ve min değerlerinin tam orta noktasına karşılık gelen bir yerdedir. Bu nedenle ADE inhibisyon kapasitesinin bir ifadesi olan IC₅₀ değerinin belirlenmesinde, y= 50 için denklem çözümlenmiştir. Dört farklı konsantrasyon için, 3 tekrar deneme için elde edilen verilerle grafik çizdirilerek örneklerin IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Ek 3' te IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi için çizilen doz-inhibisyon eğrilerine ait örnek görülmektedir.

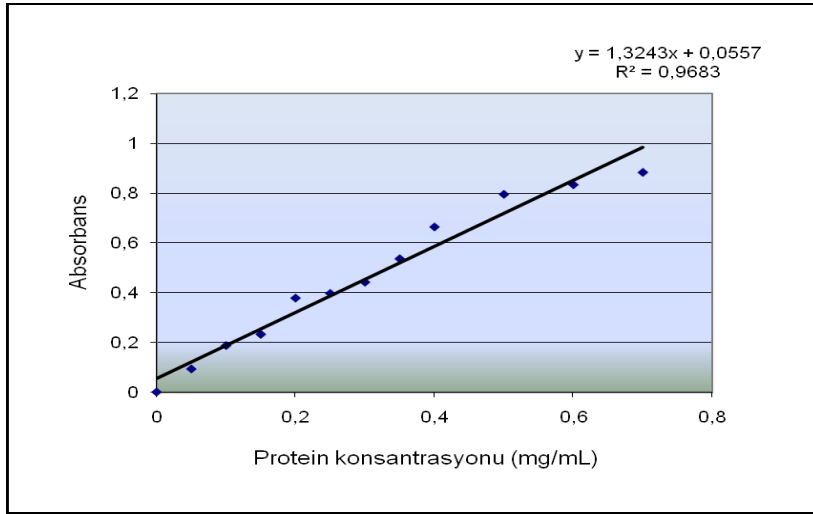
3.2.2.10. Örneklerin Protein İçeriklerinin Belirlenmesi:

UV Bölgede Absorbans Ölçümü: Hidrolizat fraksiyonlarının ve *in vitro* sindirim sonucunda elde edilen diyalizatların protein içeriklerinin belirlenmesinde UV bölgede absorbansların ölçülmesi prensibine dayalı spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır (Haris and Angal, 1995). Bu yöntem çoğu proteinin, tirozinin fenolik grubu ve triptofanın indol grubuna bağlı olarak 280 nm' de maksimum absorbans vermesine dayanmaktadır. Protein çözeltisinin absorbansı 280 nm' de ve 260 nm' de ölçülmüş ve aşağıdaki denklemden yararlanılarak protein miktarı belirlenmiştir.

$$\text{Protein (mg/mL)} = (1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260})$$

Bradford Yöntemi: Isıl işlem uygulanmış örneklerin ve ham protein ekstraktlarının protein miktarları Bradford yöntemi ile saptanmıştır (Harris and Angal, 1995).

Yöntem, uygun koşullarda proteinlerin asidik ve bazik gruplarının organik boyaların dissosiyasyon gruplarıyla renkli presipitat oluşturması esasına dayanmaktadır. Boyanın bağlanması, maksimum absorbanans verdiği noktanın 465 nm' den 595 nm' ye kaymasına yol açar ve bu dalga boyunda boya ile protein kompleksinin oluşturduğu mavi rengin absorbanansı ölçülür. Yöntem, Harris and Angal (1995)' in önerdiği şekilde ancak bazı modifikasyonlar gerçekleştirilerek uygulanmıştır. 100 µL örnek üzerine 2 mL Bradford reaktifi eklenmiş ve 10 dak. oda sıcaklığında inkübasyondan sonra deiyonize suyla hazırlanmış köre karşı 595 nm' de absorbanansı ölçülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış hemoglobin standardıyla çizilen kalibrasyon grafiğinden yararlanarak örnekteki protein miktarı belirlenmiştir. Şekil 3.3' te kalibrasyon grafiği verilmiştir.



Şekil 3.3. Bradford reaktifine ait kalibrasyon grafiği.

Bradford reaktifinin hazırlanması: 20 mg Coomassie blue G-250 tartılarak temiz bir balon joneye aktarılmıştır. 10 mL %95' lik etanol ve 20 mL %85' lik fosforik asit karıştırılıp boyanın üzerine eklenmiş ve hacim 200 mL' ye saf suyla tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcı kullanılarak çözünme gerçekleştirilmiştir. 2 kez filtre edildikten sonra koyu renkli şişeye alınarak kullanılıncaya kadar 4°C' de saklanmıştır.

3.2.2.11. İstatistiksel Analiz:

Kurubaklagillerin protein miktarları arasında, örneklerin ısı işlem, *in vitro* sindirim ve enzimatik hidrolizi takiben saptanan ADE inhibisyon kapasiteleri arasında ve ısı işlem, *in vitro* sindirim ve enzimatik hidroliz sonrasında belirlenen IC₅₀ değerleri arasında fark olup olmadığı varyans analizi (ANOVA) ile saptanmış ve farklılık SPSS for Windows (Version 10.0) paket programı kullanılarak % 95 güven aralığında Tukey testi ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kuru Baklagillerin Protein İçerikleri

Kuru fasulye, barbunya ve mercimeğin protein içerikleri Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kuru baklagillerin protein içerikleri.

Kuru baklagiller	Protein (g/100 g)*
Kuru fasulye	21,03 ± 0,95 ^a
Kuru barbunya	21,07 ± 0,1 ^a
Yeşil Mercimek	25,07 ± 0,12 ^b

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0.05).

Yeşil mercimeğin protein içeriğinin kuru fasulye ve barbunyadan daha yüksek olduğu saptanmıştır (p<0,05).

de Almeida Costa et al. (2006), bezelye, nohut, fasulye ve mercimekle yapmış olduğu çalışmada bu gıdaların protein içeriklerinin 18.5 ile 21.9 g/100 g arasında değiştiğini saptamıştır. Çiğ fasulye ve çiğ

mercimeğin 20.9 ve 20.6 g/100 g protein içerdiği belirlenmiştir. Çalışmamızın sonuçları fasulye için bu bilgilerle uyusmaktadır; ancak mercimek için bulduğumuz değer farklıdır. Bu farklılığın sebebi türler arasındaki olası varyasyon olabilir. Bahsedilen çalışmada kullanılan fasulyenin *Phaseolus vulgaris* L. cv. IAC carioca Ete' ve mercimeğin *Lens culinaris* Med.cv. Silvina olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız materyal ise *Phaseolus vulgaris* L. cv. Dermason ve *Lens culinaris* Med. cv. Sultani' dir.

4.2. Protein Ekstraktı Eldesi

Çiğ örneklerden ve ısıtılmış örneklerden protein ekstraktı elde edilmesinde hangi yöntemin kullanılmasının daha uygun olduğuna karar verilmesi için izoelektrik çöktürme, amonyum sülfat ile çöktürme ve iki yöntemin bir arada uygulanması denenmiştir. Çizelge 4.2' de 30 dakika ısıtılmış uygulanmış barbunyadan üç farklı yöntemle elde edilen ekstraktların protein miktarları verilmiştir.

Çizelge 4.2. 30 dakika ısıtılmış uygulanmış barbunyadan farklı çöktürme yöntemleriyle elde edilen ekstraktların protein içerikleri

Çöktürme yöntemi	Protein (mg/mL)
İzoelektrik (pI) çöktürme	0,1463
(NH ₄) ₂ SO ₄ ile çöktürme	0,1598
İzoelektrik çöktürme + (NH ₄) ₂ SO ₄ ile çöktürme	0,1752

Kuru baklagillerden protein ekstraktı ya da protein izolatının elde edildiği çalışmalar incelendiğinde genellikle izoelektrik çöktürme kullanıldığı görülmektedir (Adebowale and Lawal, 2003; Adebowale et al., 2007; Mwasaru et al., 1999; Pedroche et al., 2002; Tang, 2008). Ancak amonyum sülfat ile çöktürmenin uygulandığı çalışmalar da vardır (Arcan ve Yemenicioğlu, 2007). Ayrıca kimi durumlarda sadece tek bir çöktürme yönteminden farklı yöntemlerin bir arada kullanılmasının daha iyi sonuç verebileceği belirtilmektedir (Harris and Angal, 1995;).

Çizelge 4.2' den görüldüğü üzere izoelektrik çöktürme ve amonyum sülfat çöktürmesi beraber uygulandığında daha fazla protein elde edilmiştir.

4.3. Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi

Bir gıdadaki proteinlerin enzimatik hidrolizi takiben molekül ağırlıklarına göre ayrılması ve bu fraksiyonların ADE inhibisyon kapasitelerinin saptanması her ne kadar proteinlerin insan sindirim sistemindeki hidroliziyle bağdaşmasa da gıda endüstrisi açısından önemlidir. Enzimatik hidrolizle elde edilen ADE inhibisyon kapasitesi, gıdanın sahip olabileceği en yüksek inhibisyon kapasitesinin bir göstergesidir. Ayrıca molekül ağırlıklarına göre ayrılmış protein fraksiyonlarının ADE inhibisyon kapasitesinin belirlenmesi ve yüksek ADE inhibisyona sahip fraksiyonun izolasyonu ve saflaştırılması mümkün olabilmektedir. Böylece yüksek ADE inhibisyonu kapasitesine sahip protein izolatları gıda endüstrisinde fonksiyonel gıda bileşeni olarak kullanılabilir.

Çizelge 4.3' te kuru baklagillerin enzimatik hidrolizden önce ve enzimatik hidrolizden sonra ultrafiltrasyonla ayrılmış fraksiyonlarının protein miktarları verilmiştir.

Çizelge 4.3.' ten görüldüğü gibi enzimatik hidroliz sonrasında elde edilen fraksiyonların protein içerikleri toplamı başlangıç örneğe göre oldukça düşük olarak saptanmıştır ($p<0.05$). Kuru baklagillerin hidroliz verimleri karşılaştırıldığında ise en yüksek verimin fasulyede elde edildiği belirlenmiştir ($p<0.05$). Hidroliz sonrasında elde edilen verimin düşük olması çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir. Bu nedenler arasında kuru baklagil proteinlerinin vicilin ve legumin gibi globüler proteinlerden oluşması ve enzimlerin bu tip proteinlere etkisinin sınırlı olması ve/veya enzimlerin proteinler üzerindeki etkisini arttırmak amacıyla ısı işlem vb gibi herhangi bir ön işlem uygulanmaması sayılabilir. Mısır gluteninden ADE inhibitörü peptit elde edilmesinde, gıda matriksinden öncelikle nişastayı uzaklaştırmanın daha verimli bir proses olduğu belirlenmiştir (Kim et al., 2004). Çalışmada öncelikle nişasta hidroliz edilmiş ve yıkanarak uzaklaştırılmış, daha sonra enzimatik hidrolizle protein parçalanmıştır. Bu şekilde hem protein eldesinde hem de inhibisyon aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, yapılan araştırmalar hidroliz öncesinde enzimin etkinliğinin artırılması açısından ısı işlemin yararlı bir uygulama olduğunu göstermektedir (Kim et al., 2004; da Costa et al., 2007; Ovissipour et al., 2008; Cui et al., 2009). Ancak ADE inhibisyon aktivitesi açısından önemli olan, toplam protein miktarından çok elde edilen fraksiyonda biyoaktif peptitlerin var olmasıdır.

Çizelge 4.3. Kuru baklagillerde enzimatik hidroliz öncesinde belirlenen protein miktarı ve enzimatik hidroliz sonrasında elde edilen fraksiyonların protein miktarları

Kuru baklagiller	Protein miktarı* (mg/ml)					Hidroliz verimi (%)
	Hidroliz öncesi	Fraksiyonlar				
		MA < 3000 Da	3000 Da < MA < 5000 Da	MA > 5000 Da	Toplam	
Fasulye	29.58±1.58 ^a	1.1397 ± 0.08	1.1715 ± 0.02	1.1521 ± 0.03	3.4633 ^b	11.72±0.28 ^A
Barbunya	30.06±0.20 ^a	1.0212 ± 0.02	1.1088 ± 0.01	1.1501 ± 0.04	3.2801 ^b	10.91±0.16 ^B
Mercimek	36.05±0.55 ^a	1.1908 ± 0.01	1.1725 ± 0.01	1.1804 ± 0.05	3.5437 ^b	9.83±0.07 ^C

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Aynı satırdaki farklı küçük harfler istatistiksel anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0.05).

Aynı sütundaki farklı büyük harfler istatistiksel anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0.05).

Çizelge 4.4' te kuru baklagillerden enzimatik hidroliz sonrasında ultrafiltrasyonla molekül ağırlıklarına göre ayrılan protein fraksiyonlarının ADE inhibisyon etkileri görülmektedir.

Çizelge 4.4. Enzimatik hidroliz sonrasında elde edilen fraksiyonların ADE inhibisyon aktiviteleri

Fraksiyon	% ADE inhibisyonu aktivitesi*		
	Fasulye	Barbunya	Mercimek
MA<3000 Da	100.22±1.97 ^a	91.94±14.55 ^a	91.37±2.34 ^a
3000 Da<MA<5000 Da	73.02±32.56 ^b	89.44±11.51 ^a	100.44±7.69 ^a
MA>5000 Da	89.95±10.50 ^{a,b}	89.15±17.68 ^a	99.36±0.91 ^a

* Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

Aynı sütundaki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0.05).

Fasulyenin enzimatik hidrolizden sonra ultrafiltrasyonla elde edilmiş olan fraksiyonları içinde molekül ağırlığı 3000 ile 5000 Da arasında olan fraksiyonunun %ADE inhibisyonu aktivitesinin daha düşük olduğu (%73.02) belirlenmiştir (p<0.05). Barbunya ve mercimeğin ise tüm fraksiyonlarının benzer %ADE inhibisyonu aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (p>0.05). Örneklerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmış olan fraksiyonlarının %ADE inhibisyon aktivitelerinin de birbirinden farklı olmadığı görülmüştür (p>0.05).

Çizelge 4.5' te kuru baklagillerden enzimatik hidroliz sonrasında ultrafiltrasyonla molekül ağırlıklarına göre ayrılan protein fraksiyonlarının IC₅₀ değerleri görülmektedir.

Çizelge 4.5 Enzimatik hidroliz sonrasında elde edilen fraksiyonların IC₅₀ değerleri

Fraksiyon	Fasulye IC ₅₀ (µg protein/mL)*	Barbunya IC ₅₀ (µg protein/mL)*	Mercimek IC ₅₀ (µg protein/mL)*
MA<3000	74.87 ± 3.52 ^{a,A}	81.66 ± 7.55 ^{a,A}	91.85 ± 26.54 ^{a,A}
3000<MA<5000	70.52 ± 2.46 ^{a,A}	62.05 ± 9.10 ^{b,A}	106.54 ± 15.21 ^{a,B}
MA>5000	53.95 ± 1.25 ^{b,A}	43.66 ± 0.40 ^{c,B}	49.92 ± 9.42 ^{b,A,B}

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Aynı satırdaki farklı büyük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0,05).

Aynı sütundaki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0.05).

Fasulyenin enzimatik hidroliz fraksiyonlarının IC₅₀ değerlerinin 53.95 ile 74.87 µg protein/mL arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.4). Tüm fraksiyonların oldukça yüksek ADE inhibisyonu aktivitesine sahip olduğu saptanmakla birlikte en yüksek ADE inhibisyonu aktivitesi

molekül ağırlığı 5000 Da üzerinde olan fraksiyon için elde edilmiştir ($p < 0.05$).

Barbunya ve mercimeğin enzimatik hidrolizden sonra ultrafiltrasyonla ayrılmış fraksiyonlarının IC_{50} değerlerinin sırasıyla 43.66 ile 81.66 μg protein/mL ve 49.92 ile 106.54 μg protein/mL arasında olduğu belirlenmiştir.

Her üç örneğin hidrolizatlarına ait fraksiyonların önemli düzeyde ADE inhibisyonu aktivitesine sahip olduğu söylenebilir. Kim et al. (2004), mısır gluten hidrolizatını ultrafiltrasyonla molekül ağırlığı 5000 Da' dan küçük, 5000 Da ile 10000 Da arasında ve 10000 Da' dan büyük olmak üzere üç fraksiyona ayırmış ve bu fraksiyonların IC_{50} değerlerinin sırasıyla 0.05, 12.32 ve 207.33 mg protein olduğunu saptamıştır. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz değerler, bu çalışmadaki en aktif fraksiyona oldukça yakındır.

Nohut proteini leguminin alkalazla hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatın IC_{50} değerinin 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olduğu bulunmuştur (Yust et al., 2003). Hidrolizatın zıt faz kromatografisiyle 6 fraksiyona ayrılması sonucunda IC_{50} değeri 11 ile 21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arasında değişen fraksiyonlar elde edilmiştir (Pedroche et al, 2002; Yust et al., 2003).

Wu and Ding (2002), soya proteininin alkalaz ile hidroliz sonucu elde edilen hidrolizatın IC_{50} değerinin 340 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olduğunu bildirmiştir. Hidrolizatın ultrafiltrasyon ile molekül ağırlıklarına göre ayrılmış fraksiyonlarından 5000 Da altında olan fraksiyonun IC_{50} değerinin 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5000-10000 Da arasında olan fraksiyonun IC_{50} değerinin 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 10000-20000 Da arasında olan fraksiyonun IC_{50} değerinin 260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda fasulye, barbunya ve

mercimek için tespit ettiğimiz IC₅₀ değerlerinin soya fasulyesi için elde edilen değerlerden daha düşük olması önemli bir bulgudur.

Saflaştırılmış β -laktoglobulinin tiriptik hidrolizatının ultrafiltrasyonla fraksiyonlara ayrılması sonucu molekül ağırlığı 3000 Da' dan küçük olan fraksiyonun ADE inhibisyon yüzdesinin daha fazla olduğu tespit edilmiş ve IC₅₀ değerinin 130 μ g/mL olduğu belirtilmiştir (Mullally et al., 1997).

Vermeirssen et al (2005), bezelye hidrolizatının IC₅₀ değerinin 70 μ g/mL olduğunu belirtmiştir. Bu sonuç kuru baklagiller için elde ettiğimiz IC₅₀ değerleriyle uyumludur.

Yer fıstığının alkalaz ile hidrolizinin çiğ yer fıstığı için IC₅₀ değerinin 8.7 ile 122 μ g/mL arasında, kavrulmuş yer fıstığı için 12 ile 235 μ g/mL arasında değiştiği gösterilmiştir (Quist et al., 2009).

del Castillo et al.(2007), glutenin 120 °C' de 45 dakika, 150 °C' de 30 dakika ısı işlem uygulanmasıyla elde edilen Maillard reaksiyonu ürünlerinin IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 139 ve 156 μ g/mL olduğunu tespit etmiştir. Ultrafiltrasyonla molekül ağırlıklarına göre ayrılan fraksiyonlardan MA 3000 Da üzerinde olan fraksiyonun IC₅₀ değerinin yaklaşık olarak 2 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir.

Yapılan çalışmalar daha çok düşük molekül ağırlıklı peptitlerin ADE inhibisyon aktivitesi gösterdiğini kanıtlar niteliktedir. Oysa çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar molekül ağırlığı 5000 Da'un üzerindeki fraksiyonların daha fazla aktivite gösterdiği yönündedir. Fasulye, barbunya ve mercimek için elde edilen sonuçlar molekül ağırlığı 5000 Da üzerinde olan fraksiyonun daha yüksek ADE inhibisyonu aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir (p<0.05). Fasulye ve mercimeğin MA 3000

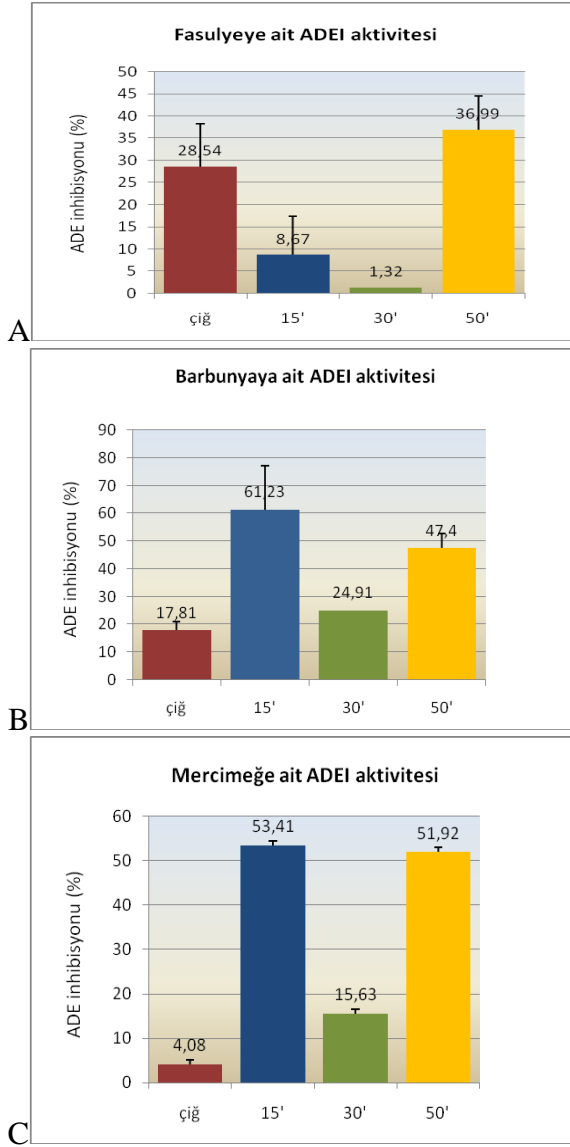
Da' dan küçük ve 3000 ile 5000 Da arasında olan fraksiyonlarının benzer olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Çoğu çalışma molekül ağırlığı ile ADE inhibisyonu aktivitesi arasında zıt yönlü bir ilişki olduğunu gösterse de, ADE inhibitörü peptitler için asıl vurgulanan, molekülün karboksil ucunda prolin gibi polar aminoasitlerin yer almasıdır (Korhonen and Pihlanto, 2006; Hartmann and Meisel, 2007). Prolince zengin proteinler ya da peptitlerin antihipertansif peptitlerin öncüsü olduğu tahmin edilmektedir (Kamath et al., 2007). Ayrıca Yust et al. (2003), metiyonin içeren peptitlerin ADE inhibisyonu aktivitesi gösterdiğini vurgulamıştır. Baklagillerin kükürt içeren aminoasitlerce zengin olması (Whitney et al.,1990) çalışmada elde ettiğimiz yüksek ADE inhibisyonu aktivitesinin kurubaklagil proteinlerinin bileşiminde bulunan metiyoninden kaynaklanabileceği görüşünü desteklemektedir.

4.4. Isıl İşlemin ADE İnhibisyonu Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bu aşamada gıdanın yapısında inaktif halde bulunan biyoaktif peptitlerin gıda işleme sırasında açığa çıkabileceği savından yola çıkarak, kuru baklagillere uygulanan ısıl işlemin ADE inhibitörü biyoaktif peptitler üzerine etkisi araştırılmıştır. Bir diğer neden ise kuru baklagillerin herhangi bir ısıl işlem uygulanmadan tüketimlerinin mümkün olmamasıdır.

Kuru fasulye, barbunya ve yeşil mercimeğin 121.1 °C' de 15, 30 ve 50 dakika sürelerince pişirilmesinin ADE inhibisyonu üzerine etkisi çığ örneklerle karşılaştırmalı olarak Şekil 4.1' de verilmiştir. Ancak buradaki inhibisyon değerleri işlem koşulları nedeniyle çığ örneklerde 10 g üzerinden, pişmiş örneklerde ise 5 g üzerinden (pişme sırasında gerçekleşen hacim artışı nedeniyle) belirlenmiştir.



Şekil 4.1. A) Fasulyeye, B) Barbunyaya, C) Mercimeğe uygulanan farklı ısıtma işlem parametrelerinin ADE inhibisyonu aktivitesi üzerine etkisi.

Isıl işlem uygulanmış fasulye, barbunya ve mercimekte, IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan modele uygun %50' nin üzerinde inhibisyon verisi elde edilememiştir. Bu nedenle bu örnekler için IC_{50} değeri yerine % inhibisyon kapasiteleri belirlenmiş ve sonuçlar inhibisyon kapasiteleri üzerinden yorumlanmıştır.

Barbunya ve mercimekten farklı olarak çığ kuru fasulyenin ADE inhibisyonu aktivitesi (Şekil 4.1.A) 50 dakika ısıl işlem uygulanmış kuru fasulyenin ADE inhibisyonu aktivitesi ile benzer bulunmuştur ($p>0.05$). 15 dakika ısıl işlem uygulanmış örneğin ADE inhibisyonu aktivitesinde azalma saptanmış (Şekil 4.1.A); ancak çığ kuru fasulyenin ADE inhibisyonu aktivitesinden farklı bulunmamıştır ($p>0.05$). 30 dakika ısıl işlem uygulaması ise ADE inhibisyonu aktivitesinde önemli azalma ile sonuçlanmıştır ($p<0.05$).

Literatürde *Phaseolus* türleri proteinlerinin başlıca, bir glikoprotein olan vicilin (MA 150-250 kDa) ve daha düşük oranda leguminden (MA 20-40 kDa) oluştuğu belirtilmektedir. *Phaseolus* türlerine uygulanan ısıl işlemin proteinde yeni disülfid köprüleri oluşumuna neden olduğu ve dolayısıyla jelleşme kapasitesinin değiştiği belirtilmiştir (Tang, 2008). 15 ve 30 dakika uygulanan ısıl işlemi takiben kuru fasulyenin ADE inhibisyon kapasitesinin azalması, protein yapısında ısıl işleme bağlı olarak gerçekleşen çapraz bağlar (yeni S-S bağ oluşumu vb) nedeniyle protein molekülünün özelliğinin değişmesinden kaynaklanmış olabilir. Cui et al. (2009), sıcaklıkla birlikte protein molekülünde bulunan S-H bağları seviyesinin azalırken S-S bağları seviyesinin arttığını belirtmiştir. Genellikle disülfid bağlarının proteinin konformasyonunu stabilize ettiği ve termodinamik stabilitesini geliştirdiği düşünülmektedir. Bu bağlamda, ısıl işlemin etkisiyle yeni disülfid bağlarının oluşumunun proteinin parçalanmasını ve dolayısıyla protein sekansında bulunabilecek ADE

inhibitörü peptitlerin açığa çıkmasını engellemiş olabileceği düşünülmektedir. Kuru fasulyenin kükürt içeren aminoasitlerce zengin olması (Whitney et al.,1990) bu görüşü desteklemektedir. 50. dakika sonunda 15. ve 30. dakikalara göre ADE inhibisyonu kapasitesinin artması ise 15-30 dakikalık ısı işlem sırasında hala protein yapısında inaktif halde bulunan biyoaktif peptitlerin açığa çıkmasından kaynaklanabilir. Yaptığımız literatür taraması sonucunda ısı işlem uygulanmış *Phaseolus* türlerinden izole edilen proteinlerin ADE inhibisyonu aktivitesi üzerine etkisini saptayan çalışmalara rastlanmamıştır.

Barbunya örneklerinden elde edilen protein ekstraktlarının ADE inhibisyonu kapasitesi üzerine etkileri incelendiğinde (Şekil 4.1.B) 15 ve 50 dakika ısı işlem gören barbunyadan elde edilen protein ekstraktlarının ADE inhibisyonu kapasitesinin benzer olduğu görülmektedir ($p>0.05$). En düşük ADE inhibisyonu kapasitesi çığ barbunyadan elde edilen protein ekstraktı için saptanmıştır. Bu sonuçlar 15 dakika ısı işlem sonrasında ADE inhibitörü peptitlerin protein sekansında aktif hale geçtiğini düşündürmektedir. İnhibisyon kapasitesi 30 dakikalık ısı işlem sonunda 15 dakika uygulanan ısı işlemde elde edilen inhibisyon kapasitesine göre azalmakla birlikte 50 dakika sonunda artmıştır. Literatür taraması sonucunda ısı işlem uygulanmış *Phaseolus* türlerinden izole edilen proteinlerin ADE inhibisyonu aktivitesi üzerine etkisini saptayan çalışmalara rastlanmamıştır.

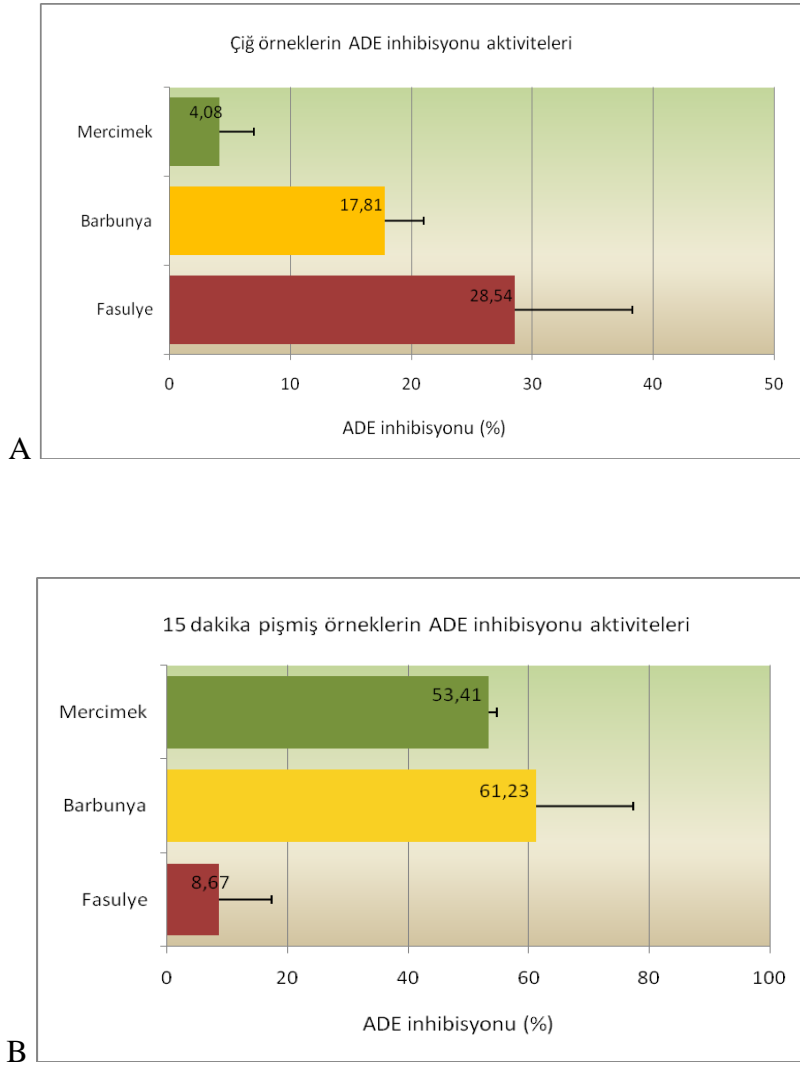
Mercimek örneklerinden elde edilen protein ekstraktlarının ADE inhibisyonu kapasiteleri incelendiğinde (Şekil 4.1.C) çığ örneğinin ADE inhibisyonu kapasitesinin en düşük olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Ancak 15 dakikalık ısı işlem sonucunda ADE inhibisyonu kapasitesi önemli ölçüde artmıştır. Isıl işlemin süresi 30 dakikaya uzadığında ise

inhibisyon aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, barbunya örneğinde elde edilen sonuca benzer şekilde, 50 dakikalık ısı işlem sonunda ADE inhibisyonu kapasitesi tekrar artarak 15 dakikalık ısı işlem sonrasında elde edilen kapasiteye denk konuma ulaşmıştır ($p>0.05$).

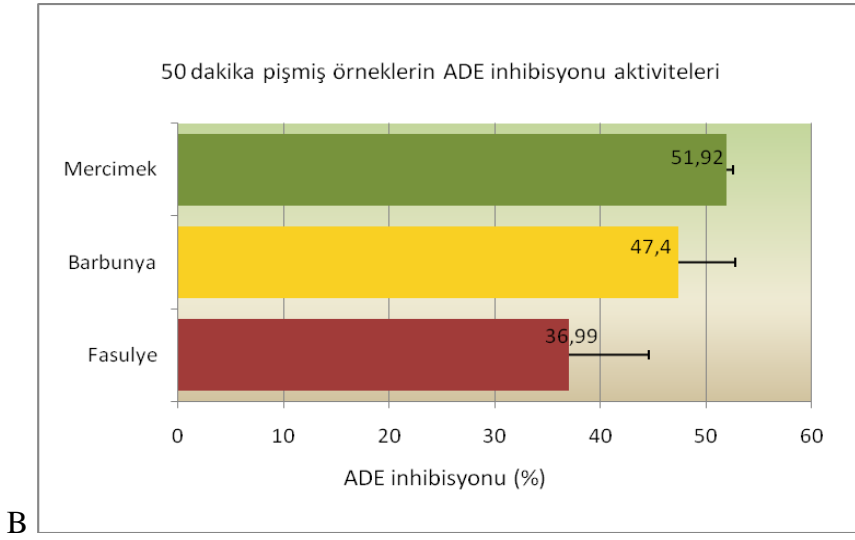
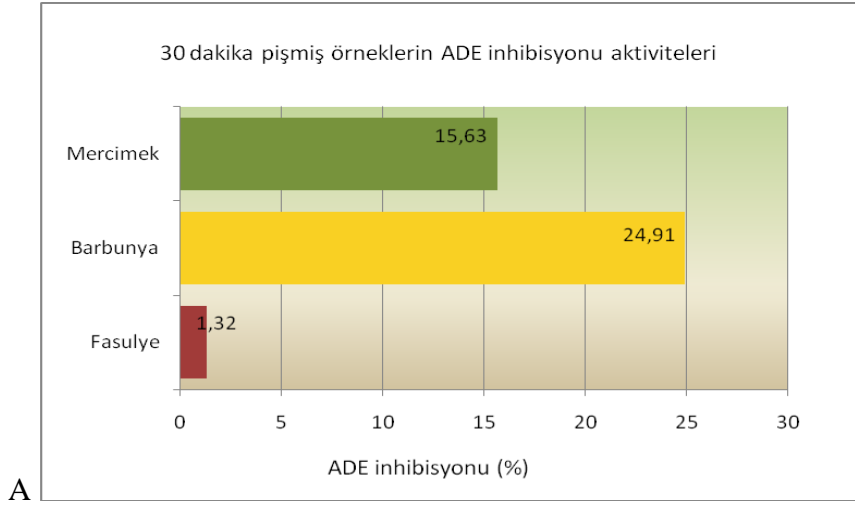
Her üç örneğin ısı işlem sonrası ADE inhibisyonu kapasiteleri birlikte incelendiğinde 50 dakikalık ısı işlem sonrasında tüm örneklerin ADE inhibisyonu kapasitelerinin artmış olduğu görülmektedir. Bu durum, bu üç kuru baklagil için 50 dakikalık ısı işlemin ADE inhibitörü peptit eldesinde yararlı bir uygulama olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.2 ve 4.3' te üç kurubaklagil örneğinin ısı işlem sonrası ADE inhibisyonu aktivitelerinin karşılaştırılması görülmektedir. Örneklerin ısı işlem sonrası ADE inhibisyonu aktiviteleri kendi aralarında birbirleriyle karşılaştırıldığında fasulyenin, 15 ve 30 dakikalık ısı işlem sonunda en düşük ADE inhibisyon aktivitesi gösteren çeşit olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Ancak 50 dakikalık ısı işlem sonrasında elde edilen ADE inhibisyon aktivitelerinin benzer olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$). 15 dakikalık ısı işlem sonrası elde edilen ADE inhibisyonu aktiviteleri barbunya ve mercimek için istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Ancak 30 dakika ısı işlem gören örnekler içinde barbunyanın inhibisyon kapasitesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Çiğ fasulye, %28.4' lük değeri ile en fazla ADE inhibisyonu aktivitesine sahip örnek gibi gözükmeyle birlikte, ADE inhibisyon kapasitesinin barbunya ile benzer olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.2.A) Çiğ, B) 15 dakika ısıtılmış örneklerin ADE inhibisyonu aktiviteleri



Şekil 4.3.A) 30 dakika, B) 50 dakika ısıtılmış örneklerin ADE inhibisyonu aktiviteleri

4.5. *In vitro* sindirim

Asıl protein sekansında inaktif halde bulunan biyoaktif peptitlerin açığa çıkmasını sağlayan diğer bir işlem sindirimdir. Sindirim sırasında, gastrointestinal sistemdeki proteolitik enzimlerin etkisiyle biyoaktif peptitlerin oluştuğu bilinmektedir (Meisel, 1997; Yust et. al, 2003; Korhonen and Pihlanto, 2006; Hartmann and Meisel, 2007; Wang et. al, 2008). ADE inhibitörü peptitlerin *in vivo* antihipertansif etki gösterebilmesi için kardiyovasküler sisteme aktif formda ulaşması gerektiği bildirilmiştir (Vermeirssen et al., 2005). Bu nedenle oral yolla alındıktan sonra gastrointestinal proteazlar tarafından tamamen parçalanmaya karşı dayanıklı olmaları ve aktivitelerini koruyarak ince bağırsaklardan emilmeleri gerekmektedir. Çalışmanın bu aşamasında ısı işlem uygulanmış örneklerin *in vitro* sindirimi sonucunda elde edilen mide ve bağırsak diyalizatlarının ADE inhibisyonu kapasiteleri araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle farklı protein konsantrasyonlarına seyreltilen diyalizatların IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. IC₅₀ değerinin belirlenmesinde geçerli olan model, doz-inhibisyon ilişkisine uyumlu olan denge bağıntısının (equilibrium binding) çözümlenmesine dayanmaktadır. Doz-inhibisyon ilişkisi minimum ve maksimum inhibisyon değerleri kadar bu aralıkta girilen diğer inhibisyon değerlerine bağlı olarak $y=50$ yanıtına karşılık gelen noktadan daha farklı bir noktada (dengede) yanıt verebilir.

Isıl işlem uygulanmış örneklerin *in vitro* sindiriminden sonra elde edilen diyalizatlardan bu modele uygun olanların IC₅₀ değerleri saptanabilmiştir. Bu sonuca göre, IC₅₀ değerleri fasulye örneğinin 15 dakika ısı işlem uygulandıktan sonra elde edilen mide ve ince bağırsak diyalizatları ile 30 dakika ısı işlem uygulandıktan sonra elde edilen ince bağırsak diyalizatı için, barbunya örneğinin ise 15 dakika ısı işlem

uygulandıktan sonra elde edilen ince bağırsak diyalizati, 30 dakika ısı işlem uygulandıktan sonra elde edilen mide diyalizati, 50 dakika ısı işlem uygulandıktan sonra elde edilen mide ve ince bağırsak diyalizati için saptanabilmiştir. Diğer örneklerde elde edilen sonuçlar bu modele uygun olmadığı için, ADE inhibisyonu aktivitesinin ifade edilmesinde inhibisyon indeksi (% inhibisyon aktivitesi) kullanılmıştır.

Çizelge 4.6.'da ısı işlem görmüş kuru baklagillerin *in vitro* sindirimden sonra elde edilen mide ve ince bağırsak diyalizatlarına ait protein içerikleri görülmektedir. Burada belirlenen protein miktarı, sadece molekül ağırlığı 5000 Da' dan küçük olan peptitleri içermektedir. Bunun nedeni, ADE inhibisyonu aktivitesinin belirlenmesinde sindirim enzimlerinin etkisini önlemektir. Sindirim enzimlerinin molekül ağırlığı 5000 Da'dan büyük olduğu için filtratta bu enzimler bulunmamaktadır.

Çizelge 4.6. Isıl işlem sonrası *in vitro* sindirimden elde edilen diyalizatların protein içerikleri

Kurubaklagiller	Protein miktarı ^a (mg/ml)					
	Isıl İşlem (121.1°C) süresi					
	15 dakika		30 dakika		50 dakika	
	Mide diyalizati*	Bağırsak diyalizati*	Mide diyalizati*	Bağırsak diyalizati*	Mide diyalizati*	Bağırsak diyalizati*
Fasulye	1.0393 ± 0.29	0.9267 ± 0.39	1.397 ± 0.05	0.9659 ± 0.39	1.1752 ± 0.01	1.0329 ± 0.21
Barbunya	1.164 ± 0.02	1.083 ± 0.08	1.1479 ± 0.001	1.1328 ± 0.001	1.1818 ± 0.01	1.1875 ± 0.001
Mercimek	1.1367 ± 0.05	0.9678 ± 0.4	1.1542 ± 0.006	0.8800 ± 0.26	1.1316 ± 0.08	0.9436 ± 0.23

* MA < 5000 Da

^a Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Çizelge 4.7' de fasulye örneklerinin *in vitro* sindirim sonrasındaki IC₅₀ değerleri görülmektedir. 15 dakika ısıtma işlemi uygulamasından sonra elde edilen mide ve ince bağırsak diyalizatlarına ait IC₅₀ değerlerinin benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (p>0.05). 30 dakikalık ısıtma işleminden sonraki *in vitro* sindirimi takiben elde edilen bağırsak diyalizatının IC₅₀ değerinin ise daha yüksek olduğu (281.69 µg/mL) belirlenmiştir (p<0.05). Bu durum 30 dakikalık ısıtma işlemi uygulamasının 15 dakikalık ısıtma işlemi uygulamasına göre ince bağırsağa geçen ADE inhibitörü peptitlerin inhibisyon aktivitesinde azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Bu azalma 30 dakikalık ısıtma işlemi sonrasında açığa çıkan biyoaktif peptitlerin 15 dakikalık ısıtma işlemi sonrasında açığa çıkan peptitlerden farklı olmasından ya da peptitlerin pankreatik enzimlere karşı direncinin azalmasından kaynaklanmış olabilir. Benzer olarak Wu and Ding (2002) soya proteini hidrolizatının gastrointestinal proteazlara karşı stabilitesini inceledikleri çalışmada enzim uygulamasından önceki IC₅₀ değerinin 65 µg/mL iken pepsin ve pankreatin uygulamasından sonra IC₅₀ değerinin sırasıyla 66 ve 73 µg/mL olduğunu saptamışlardır.

Çizelge 4.7. Fasulye örneklerinin *in vitro* sindirim sonrasındaki IC₅₀ değerleri

Fasulye <i>in vitro</i> sindirim	IC ₅₀ değeri* (µg protein/mL)
15 dakika-mide	114,62±0,85 ^a
15 dakika-bağırsak	99,14±14,95 ^a
30 dakika-bağırsak	281,69±6,92 ^b

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0.05).

Çizelge 4.8' de barbunya örneğinin *in vitro* sindirimini takiben elde edilen diyalizatlarının IC₅₀ değerleri görülmektedir. Barbunya için hesaplanan IC₅₀ değerlerinin birbirinden farklı olduğu tespit edilmiş ve en düşük IC₅₀ değerine sahip diyalizatın 50 dakika ısıl işlem sonrasında elde edilen mide diyalizatı olduğu belirlenmiştir. Barbunyanın *in vitro* sindirim sonrası saptanan IC₅₀ değerlerinin 65.14 ile 313.49 µg protein/mL arasında, fasulyenin ise 99.14 ile 281.69 µg protein/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. Vermeirssen et al. (2003, 2004) bezelyenin gastrointestinal sindirim hidrolizatının IC₅₀ değerinin 76 µg/mL olduğunu belirtmiştir. Yer fıstığının pepsin-pankreatin hidrolizinin ise çiğ yer fıstığı için 7.93 ile 188.7 µg/mL, kavrulmuş yer fıstığı için ise 11.09 ile 99.82 µg/mL arasında değişen IC₅₀ değerlerine sahip hidrolizatlar verdiği belirtilmiştir (Quist et al, 2009). Çalışmada elde ettiğimiz verilerin, bu araştırmacıların bulgularıyla paralellik gösterdiği söylenebilir.

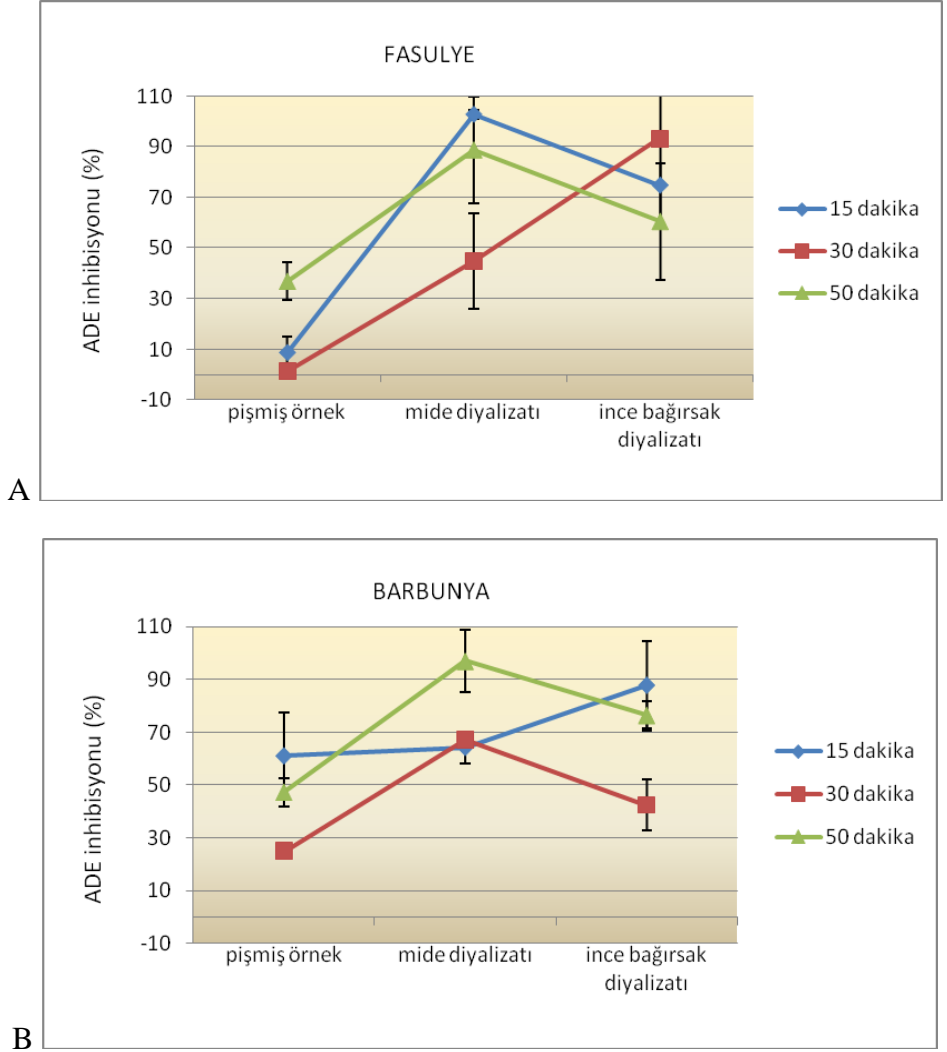
Çizelge 4.8. Barbunya örneklerinin *in vitro* sindirim sonrasındaki IC₅₀ değerleri

Barbunya <i>in vitro</i> sindirim	IC ₅₀ değeri* (µg protein/mL)
15 dakika- bağırsak	313,49±13,70 ^a
30 dakika- mide	171,34±16,57 ^b
50 dakika- mide	65,14±9,28 ^c
50 dakika- bağırsak	211,75±0,55 ^d

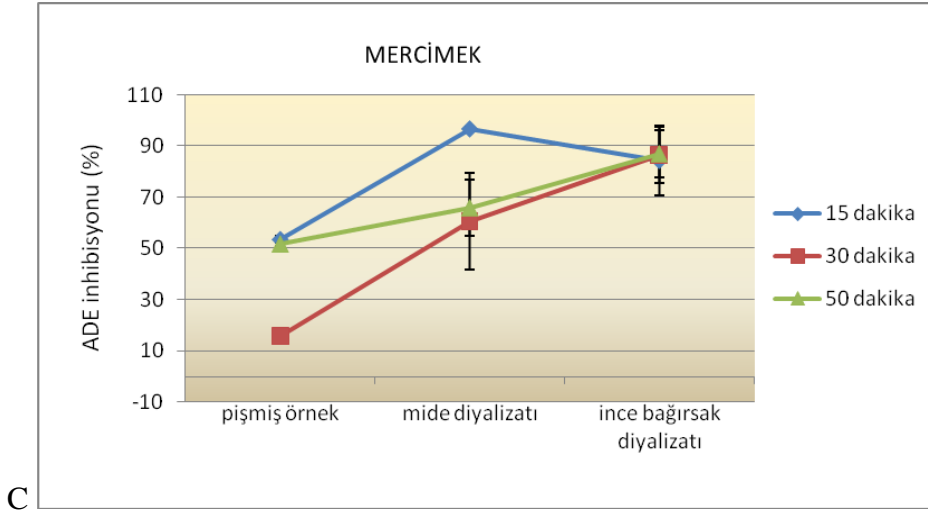
*Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0.05).

Şekil 4.4’de ısıt işlem uygulandıktan sonra *in vitro* sindirime tabi tutulan örneklerin ADE inhibisyonu aktiviteleri (% inhibisyon) görülmektedir.



Şekil 4.4.A) Fasulye, B) Barbunya, C) Mercimek örneklerinin ADE inhibisyonu aktiviteleri üzerine *in vitro* sindirim prosesinin etkisi



Şekil 4.4.A) Fasulye, B) Barbunya, C) Mercimek örneklerinin ADE inhibisyonu aktiviteleri üzerine *in vitro* sindirim prosesinin etkisi

Fasulye örneğinin *in vitro* sindirim sırasında ADE inhibisyonu aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Her ne kadar 50 dakikalık ısıl işlem sonrasında gerçekleştirilen *in vitro* sindirimden elde edilen ince bağırsak diyalizatında, ADE inhibisyon aktivitesi mide diyalizatından daha düşük gibi gözükse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). 15, 30 ve 50 dakikalık ısıl işlemden sonra uygulanan *in vitro* sindirimin, fasulyenin ADE inhibisyonu kapasitesini arttırdığı görülmektedir (Şekil 4.4.A). Bu sonuç beklenen bir durumdur. ADE inhibitörü peptitlerin gastrointestinal sindirim sırasında ortaya çıktığı ve sindirim prosesinin ADE inhibitörü peptitlerin asıl protein sekansından salınması konusunda çok verimli bir proses olduğu bilinmektedir (Korhonen and Pihlanto, 2006; Hartmann and Meisel, 2007). Hernandez-Ledesma et al (2004), pepsin ile hidroliz edilen süt proteini bazlı bebek

mamasının ADE inhibisyonu aktivitesinde artış saptandığını, pankreatik ekstraktla hidroliz sonrasındaysa ADE inhibisyon aktivitesinde bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Buna karşın peynir altı suyu proteini içeren bebek mamasının hidroliz öncesinde ve sonrasında saptanan ADE inhibisyonu değerlerinin benzer olduğu belirtilmiştir.

Barbunya örneğinin ısıtıl işlem sonrası *in vitro* sindirimi takiben ADE inhibisyonu aktivitesindeki değişimi incelendiğinde (Şekil 4.4.B), 30 dakikalık ısıtıl işlem sonrasında *in vitro* sindirim ile elde edilen ince bağırsak diyalizatının ADE inhibisyonu kapasitesinin, 50 dakika ısıtıl işlem sonrasında *in vitro* sindirim ile elde edilen ince bağırsak diyalizatının ADE inhibisyonu kapasitesinden düşük olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Bu sonuç, çalışmada ısıtıl işlemin ADE inhibisyonu kapasitesi üzerine etkisini saptama aşamasında 50 dakikalık ısıtıl işlem için elde edilen ADE inhibisyonu aktivitesiyle de (30 dakikalık ısıtıl işleme göre daha yüksek) paralellik göstermektedir. 30 dakika ısıtıl işlem uygulanmış barbunyanın *in vitro* sindirimini takiben elde edilen ince bağırsak diyalizatının ADE inhibisyonu kapasitesinin mide diyalizatında elde edilen ADE inhibisyonu kapasitesinden düşük olması (% 37 oranında), bu biyoaktif peptitlerin ince bağırsaktaki sindirim enzimlerine dirençli olmadığını göstermektedir. 50 dakika ısıtıl işlem görmüş barbunyanın *in vitro* sindirimini takiben elde edilen ince bağırsak diyalizatının ADE inhibisyonu aktivitesinde de mide diyalizatına göre azalma olmakla birlikte (% 21 oranında), iki ısıtıl işlem süresi karşılaştırıldığında 50 dakika ısıtıl işlem uygulamasının, ince bağırsaktaki sindirim enzimlerine daha dirençli biyoaktif peptitlerin oluşumuna olanak sağladığı söylenebilir.

Mercimek örneğinin ısıtıl işlem sonrası *in vitro* sindirimini takiben ADE inhibisyonu aktivitesindeki değişimi incelendiğinde (Şekil 4.4.C)

sindirim prosesinden sonra elde edilen mide ve ince bağırsak diyalizatlarında ADE inhibisyonu aktivitesinin arttığı görülmektedir. Farklı ısı işlem parametrelerinde mide diyalizatları için elde edilen ADE inhibisyon kapasiteleri değerlendirildiğinde, en yüksek ADE inhibisyon kapasitesini sağlayan parametrenin 15 dakika ısı işlem uygulaması olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Ancak ince bağırsak diyalizatlarının ADE inhibisyonu kapasiteleri incelendiğinde tüm ısı işlem parametrelerinin benzer ADE inhibisyonu kapasitelerine sahip olduğu görülmüştür ($p > 0.05$).

da Costa et al. (2007), peynir altı suyu proteininin ısı işlem uygulanmış ve uygulanmamış protein izolatının enzimatik hidrolizatları içinde en yüksek inhibisyon aktivitesi gösteren örneğin 65 °C' de 15 dakika ısı işlem uygulanan ve daha sonra α -kimotripsin ile hidroliz edilen protein izolatu olduğu belirlenmiştir.

15 dakika ısı işlem uygulanan örneklerin *in vitro* sindirimi sonrasında elde edilen mide ve bağırsak diyalizatlarının ADE inhibisyonu aktivitesi karşılaştırıldığında fasulye için elde edilen mide diyalizatının ADE inhibisyonu aktivitesi barbunya ve yeşil mercimeğin mide diyalizatı için elde edilen ADE inhibisyonu aktivitesinden daha yüksek olarak bulunmuştur ($p < 0.05$). Bağırsak diyalizatları arasında en yüksek ADE inhibisyon aktivitesine sahip örnek barbunya gibi gözükmekle birlikte (% 87.72) fasulye ve barbuynadan elde edilen bağırsak diyalizatlarının ADE inhibisyon etkilerinin istatistiksel açıdan farklı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

30 dakika ısı işlem uygulanan örneklerin *in vitro* sindirimi sonrasında elde edilen mide ve bağırsak diyalizatlarının ADE inhibisyonu aktivitesi karşılaştırıldığında barbunya için elde edilen mide diyalizatının ADE inhibisyonu aktivitesinin fasulye için elde edilen

değerden daha yüksek olduğu ancak mercimek ile benzerlik gösterdiği görülmektedir ($p<0.05$). Buna karşın barbunyadan elde edilen bağırsak diyalizatının ADE inhibisyonu aktivitesinin (% 42,55) fasulye (% 93,41) ve mercimek için elde edilen değerden (% 86,52) daha düşük olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

50 dakika ısı işlem uygulanan örneklerin *in vitro* sindirimi sonrasında elde edilen mide ve bağırsak diyalizatlarının ADE inhibisyonu aktivitesi karşılaştırıldığında, barbunyanın mide diyalizatı için elde edilen ADE inhibisyonu kapasitesinin mercimeğin mide diyalizatının ADE inhibisyonu kapasitesinden daha yüksek olduğu saptanmış ($p<0.05$), fasulyeyle ise benzer bulunmuştur. En yüksek ADE inhibisyonu kapasitesine sahip bağırsak diyalizatının mercimek örneğinde elde edildiği gözükmele birlikte, örnekler arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

5. SONUÇ

Son yıllarda, biyoaktif peptitler üzerine bilim dünyasında ve gıda endüstrisinde yapılan çalışmalar içerisinde ADE inhibitörü peptitlerin büyük bir payı vardır. ADE inhibitörü peptitler ve kaynakları ile ilgili olarak yapılmış araştırmalar incelendiğinde, süt ve süt ürünleri, et ve balık üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Ancak son zamanlarda bitkisel gıda kaynaklı ADE inhibitörleri üzerinde çalışıldığı da dikkati çekmektedir. Tahıllar ve baklagiller de bu grupta önemli bir yere sahiptir.

Kurubaklagiller, diğer tüm sağlık faydalarının yanında özellikle içerdikleri yüksek miktardaki protein nedeniyle beslenme rehberlerinin üzerinde önemle durduğu gıdalardır. Türk halkının beslenme modelinde kurubaklagiller önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle kurubaklagil proteinlerinin potansiyel ADE inhibitörü etkilerinin belirlenmesi önemli bir konudur.

Çalışmada, Türkiye’ de yetiştirilen ve Türk mutfağında önemli bir yere sahip olan kuru fasulye, kuru barbunya ve yeşil mercimeğin ADE inhibitörü peptit kaynağı olarak değerlendirip değerlendirilemeyeceği konusu araştırılmıştır.

ADE inhibitörü peptitlerin elde edilmesinde en fazla kullanılan yöntem enzimatik hidrolizdir. Araştırmada, kurubaklagillerin ticari bir proteolitik enzim preparatı olan Pronase E ile hidroliz edildiği kısımda, kuru fasulye, kuru barbunya ve yeşil mercimeğin önemli derecede ADE inhibisyonu aktivitesine yol açan hidrolizatlar oluşturduğu belirlenmiştir. Diğer gıda kaynaklarına göre oldukça yüksek aktiviteye sahip hidrolizatlar elde edilmiştir. Fasulye, barbunya ve mercimeğin, literatürde β -laktoglobulin, peynir altı suyu, bazı yoğurt türleri, mısır,

mung fasulyesi ve soya fasulyesinin enzimatik hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatlar için bildirilen IC_{50} değerlerinden daha düşük IC_{50} değerlerine sahip olduğu görülmüştür.

Enzimatik hidrolizden sonra, elde edilen hidrolizat ultrafiltrasyonla molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlara ayrılarak ADE inhibitörü peptitlerce zengin olan fraksiyon belirlenebilmekte ve konsantre edilebilmektedir. Araştırmada üç kurubaklagil çeşidinin de enzimatik hidrolizi takiben ultrafiltrasyonla elde edilen üç farklı fraksiyonu arasında, en düşük IC_{50} değerine sahip olan fraksiyonun molekül ağırlığı 5000 Da' dan büyük olan fraksiyon olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Fasulyenin molekül ağırlığı 3000 Da' dan küçük ve 3000 ile 5000 Da arasında olan hidrolizatlarının IC_{50} değerleri arasında fark bulunmazken ($p > 0.05$), barbunyanın molekül ağırlığı 3000 Da' dan küçük, 3000 ile 5000 Da arasında olan ve 5000 Da' dan büyük hidrolizatlarının IC_{50} değerlerinin birbirinden farklı olduğu ($p < 0.05$) tespit edilmiştir. Fasulyeye benzer şekilde mercimeğin molekül ağırlığı 3000 Da' dan küçük ve 3000 ile 5000 Da arasında olan fraksiyonları arasında IC_{50} değerleri açısından fark olmadığı saptanmıştır.

Örneklerin molekül ağırlığı 3000 Da' dan küçük olan fraksiyonlarının IC_{50} değerleri arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmazken ($p > 0.05$), molekül ağırlığı 3000 ile 5000 Da arasındaki fraksiyonlar için fasulye ve barbunyanın, molekül ağırlığı 5000 Da' dan büyük fraksiyon için barbunya ve mercimeğin IC_{50} değerlerinin benzer olduğu saptanmıştır.

Molekül ağırlığı 5000 Da' un üzerindeki fraksiyonlarda ADE inhibisyonu aktivitesinin daha yüksek çıkması, literatürde genellikle molekül ağırlığı 3000 Da' dan küçük olan fraksiyonlar için daha yüksek ADE inhibisyon kapasitesi saptanması bulgusu ile uyuşmamakla birlikte

bizim araştırmada kullandığımız hammaddelerin farklı olması nedeniyle beklenen bir sonuçtur. ADE inhibisyonu üzerinde etkili olan başlıca faktörün, peptitlerin sekansı olduğu ve prolin ile metiyonin aminoasitleri bakımından zengin olan proteinlerin ADE inhibitörü peptitlerin öncüsü olabileceği belirtilmektedir. Kurubaklagillerin kükürt içeren aminoasitlerce zengin olması (metiyonin, sistin gibi) yüksek ADE inhibisyonu aktivitesine yol açtığını düşündürmektedir.

Enzimatik hidroliz verimi üç kurubaklagil için de düşük olmakla birlikte elde edilen hidrolizatların ADE inhibisyonu aktiviteleri yüksek olarak saptanmıştır. Enzimatik hidrolizden önce örneklere uygun bir ön işlem uygulanması halinde verimin daha fazla olacağı düşünülmektedir.

Gıda işlemede en yaygın yöntemin ısıl işlem olduğu ve kurubaklagillerin tüketiminin ısıl işlem olmadan mümkün olmadığı düşünülürse, kurubaklagillerin ADE inhibisyonu aktivitesine ısıl işlemin etkisinin araştırılmasının önemli olduğu açıktır.

50 dakika ısıl işlem uygulanmış fasulyenin ADE inhibisyonu ile çiğ kuru fasulyenin ADE inhibisyonu arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0.05$). 15 ve 30 dakika uygulanan ısıl işlem sonucunda ADE inhibisyonunda meydana gelen azalma, proteinin yapısında gerçekleşmesi olası değişikliklerden kaynaklanmış olabilir. Isıl işlemin molekülde disülfid bağları oluşumuna ve molekülün stabilite kazanmasına neden olduğu bilinmektedir. Isıl işlemin süresinin 50 dakikaya çıkması ile, 15 ve 30 dakikalık işlem süresince molekülde var olan ancak açığa çıkamayan inhibitör peptitlerin açığa çıkması nedeniyle ADE inhibisyonu etkisinin arttığı düşünülmektedir.

Barbunyanın ve mercimeğin de ısıl işlem uygulamasından sonraki ADE inhibisyonu aktivitelerinin fasulye ile aynı seyri izlediği

belirlenmiştir. Barbunya ve mercimeğin 15 ve 30 dakikalık ısıtılardan sonraki inhibisyon aktiviteleri benzerlik gösterirken ($p>0.05$) iki örneğin de 30 dakikalık ısıtılardan uygulaması sonunda ADE inhibisyonu aktivitesinde azalma belirlenmiştir.

Örnekler birbirleriyle karşılaştırıldığında, üç ısıtılama parametresi için de fasulyenin en düşük ADE inhibisyonu aktivitesine sahip çeşit olduğu belirlenmiş ancak 50 dakikalık ısıtılama sonrasında barbunya ve mercimek için belirlenen ADE inhibisyonunun farklı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

15 dakika ve 50 dakika sürelerince uygulanan ısıtılama sonucunda barbunya ve mercimek için elde edilen ADE inhibisyonu aktivitesi benzer bulunmuştur. Ancak barbunyanın 30 dakikalık ısıtılama sonrasında göstermiş olduğu ADE inhibisyonu aktivitesi mercimeğin bu süre sonunda gösterdiği aktiviteden daha yüksek olmuştur ($p<0.05$).

ADE inhibitörü peptitlerin insan fizyolojisinde beklenen etkiyi gösterebilmesi için sindirim prosesine dayanıklı olması, sindirim sonrasında aktivitesini koruması ve yeterli miktarda emilmesi gerekmektedir. Araştırmada, *in vitro* sindirim sonrasında örneklerin ADE inhibisyonu aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Fasulyenin ve mercimeğin tüm ısıtılama uygulamalarından sonraki *in vitro* sindirimden elde edilen bağırsak diyalizatlarının ADE inhibisyonu kapasitelerinin benzer olduğu saptanmıştır ($p>0.05$). Barbunyanın 50 dakikalık ısıtılama sonrasında uygulanan *in vitro* sindirimden elde edilen ince bağırsak diyalizatının, 30 dakikalık ısıtılama sonrasında uygulanan *in vitro* sindirimden elde edilen ince bağırsak diyalizatından daha fazla ADE inhibisyonu aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$).

Barbunya için 30 dakikalık ısıtma işlemi sonrasında *in vitro* sindirimden elde edilen mide diyalizatının ADE inhibisyonu aktivitesinin ince bağırsak diyalizatının ADE inhibisyon aktivitesinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum 30 dakika süresince uygulanan ısıtma işlemi sırasında açığa çıkan peptitlerin ince bağırsaktaki sindirim enzimlerine karşı dayanıklı olmadığını göstermektedir. 50 dakika uygulanan ısıtma işlemi takiben ince bağırsak diyalizatının ADE inhibisyon aktivitesindeki azalmanın daha az olması, 50 dakika uygulanan ısıtma işlemi sindirim enzimlerine daha dayanıklı peptitlerin oluşmasını desteklediğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, yapılan araştırmadan elde ettiğimiz bulguların, Türk halkının beslenme modelinde önemli yer tutan kuru fasulye, kuru barbunya ve yeşil mercimeğin ADE inhibitörü peptit potansiyelinin oldukça yüksek olduğunu gösterdiğini söyleyebiliriz. Enzimatik hidroliz sonucunda üç kurubaklagil çeşidinden de önemli derecede ADE inhibisyonu aktivitesi gösteren fraksiyonlar elde edilmiştir. Isıtma işlemi ADE inhibitörü peptitlerin oluşumunda yararlı bir uygulama olduğu; ancak işlem süresinin oluşan peptit profiliyle ilgili olabileceği sonucu ortaya çıkmıştır. *In vitro* sindirimin kuru fasulye, kuru barbunya ve yeşil mercimekten ADE inhibitörü peptitlerin açığa çıkmasında önemli rol oynadığı tespit edilmiş ve üç kurubaklagilin sindirime dayanıklı ADE inhibitörü peptit kaynağı olduğu belirlenmiştir.

Bu araştırmanın sonuçları;

- 1) Kuru fasulye, kuru barbunya ve yeşil mercimekten ADE inhibitörü peptit elde etmek için enzimatik hidrolizden yararlanılabileceğini, bu üç kurubaklagil çeşidinin enzimatik hidrolizatlarının endüstriyel anlamda ADE inhibitörü peptit elde edilmesi amacıyla kullanılabileceğini ve elde edilecek

biyoaktif peptitlerin gıda endüstrisinde fonksiyonel gıda bileşeni olarak değerlendirilme potansiyellerinin yüksek olduğunu,

- 2) Enzimatik hidrolizden önce enzimin moleküle daha rahat etki etmesi ve böylece hidroliz veriminin artırılması için örneklerin ısıtılma işlemi gibi ön işlemlerden geçirilmesinin faydalı olabileceğini,
- 3) Isıtılma işleminde çalışmada kullanılan kurubaklagillerin ADE inhibisyon kapasitesinde artışa neden olduğunu,
- 4) Çalışmada kullanılan kurubaklagillerin *in vitro* sindirimi sonucunda ADE inhibisyon kapasitesinin arttığını,
- 5) *In vitro* sindirim prosesi sonrasında çalışmada kullanılan kurubaklagillerden elde edilen ADE inhibitörü peptitlerin *in vitro* koşullarda sindirim enzimlerine karşı nispeten dirençli olduklarını göstermiştir.

Bu sonuçların ışığında bundan sonra bu alanda yapılacak çalışmaların;

- 6) *In vitro* sindirim prosesi açısından fasulye ve barbunyaya uygulanan farklı ısıtılma işlem parametrelerinin oluşan peptit profilini etkilediği, mercimek için etkili olmadığı' görüşünün peptit profillerinin belirlenerek desteklenmesi,
- 7) Bu kurubaklagillerden ADE inhibitörü peptitlerin izole edilmesi,

- 8) Elde edilen *in vitro* ADE inhibisyonu etkisinin *in vivo* koşullarda araştırılması konularında yoğunlaşması önerilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adebamowo, C.A., Cho, E.Y., Sampson, L., Katan, M.B., Spiegelman, D., Willett, W.C., & Holmes, M.D.,** 2005, Dietary flavonols and flavonol-rich foods intake and the risk of breast cancer, *International Journal of Cancer*, 114: 628-633.
- Adebowale, K.O. and Lawal, O.S,** 2003, Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates, *Food Chemistry*, 83: 237–246.
- Adebowale, Y.A., Adeyemi, I.A., Oshodi,A.A., and Niranjan, K.,** 2007, Isolation, fractionation and characterisation of proteins from Mucuna bean, *Food Chemistry*, 104: 287–299.
- Anonymous,** 2003, The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, US Department of Health and Human Services, 52p.
- AOAC,** 1990, Official Methods of Anaysis, Association of Official Analytical Chemist, Washington D.C.
- Arcan, İ. ve Yemenicioğlu, A.,** 2007, Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans, *Food Chemistry*, 103:301–312.
- Arıcı, M., ve Çağlar, Ş.,** 2002, Hipertansiyon ve oluşturduğu sorunlar, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(1): 4 – 9.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Bech-Larsen, T. And Grunert, K.G.**, 2003, The perceived healthiness of functional foods A conjoint study of Danish, Finnish and American consumers' perception of functional foods, *Appetite*, 40: 9-14.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R. and Wechsler, D.**, 2007, Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses, *International Dairy Journal*, 17: 968-975.
- Byun, H-G and Kim, S-K**, 2001, Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin, *Process Biochemistry*, 36:1155-1162.
- Chiu, L-H, Hsu, G-S.W., and Lu, Y-F.**, 2006, Antihypertensive capacity of defatted soft-shelled turtle powder after hydrolysis by gastrointestinal enzymes, *Journal of Food Biochemistry*, 30:589–603.
- Cui, C., Zhou, X., Zhao, M., and Yang, B.**, 2009, Effect of thermal treatment on the enzymatic hydrolysis of chicken proteins, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 37–41.
- da Costa, E.L., da Rocha Gontijo, J.A. and Netto, F.M.**, 2007, Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates, *International Dairy Journal*, 17: 632-640.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- de Almeida Costa, G.E., da Silva Queiroz-Monici, K., Reis, S.M.P.M., & de Oliveira, A.C.,** 2006, Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes, *Food Chemistry*, 94: 327-330.
- del Castillo, M.D., Ferrigno, A., Acampa, I., Borrelli, R.C., Olano, A., Martínez-Rodríguez, A. and Fogliano, V.,** 2007, In vitro release of angiotensin-converting enzyme inhibitors, peroxy-radical scavengers and antibacterial compounds by enzymatic hydrolysis of glycated gluten, *Journal of Cereal Science*, 45: 327-334.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Singhc, T.K., Vasiljevica, T and Shah, N.P.,** 2007, ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt, *International Dairy Journal*, 17: 1321–1331.
- Dueñas, M., Hernández, T. & Estrella, I.,** 2006, Assessment of in vitro antioxidant capacity of the seed coat and cotyledon of legumes in relation to their phenolic contents, *Food Chemistry*, 98: 95-103.
- Duranti, M.,** 2006, Grain legume proteins and nutraceutical properties, *Fitoterapia*, 77: 67-82.
- Erdmann, K., Cheung, B.W.Y., and Schröder, H.,** 2008, The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19:643–654.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- FitzGerald, R.J. and Meisel, H.,** 2000, Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme, *British Journal of Nutrition*, 84: 33-37.
- Fujita H, Yoshikawa M.,** 1999, LKPNM: a prodrug-type ACEinhibitory peptide derived from fish protein, *Immunopharmacology*, 44: 123-127.
- Gil-Izquierdo, A., Zafrilla, P. & Tomás-Barberán, F.A.,** 2002, An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrintestinal tract, *European Food Research Technology*, 214:155-159.
- Harris, E.L.V. and Angal, S.,** 1995, *Protein Purification Methods*, a practical approach, Oxford Univesity Press, Oxford, 317p.
- Hartmann, R. and Meisel, H.,** 2007, Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications, *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 163-169.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M. and Recio, I.,** 2004, Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas, *International Dairy Journal*, 14: 889-898.
- Hoch, G., Peterbauer, T. ve Richter, A.,** 1999, Purification and characterization of Stachyose Synthase from lentil (*Lens culinaris*) seeds: Galactopinitol and Stachyose Synthesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 366, No.1, June 1, 75-81.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., and Chi, L.,** 2008, The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs?, *Peptides*, 29: 1062, 1071.
- Howlet, J.,** 2008, *Functional Foods, From Science to Health and Claims*, ILSI Europe, Belgium, 36p.
- Jung, M.J., Heo, S-I. & Wang, M-H.,** 2008, Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*, *Food Chemistry*, 108: 482-487.
- Kamath, V., Niketh, S., Chandrashekar, A. and Rajini, P.S.,** 2007, Chymotryptic hydrolysates of a-kafirin, the storage protein of sorghum (*Sorghum bicolor*) exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activity, *Food Chemistry*, 100: 306-311.
- Kawasaki, T., Seki, E., Osajima, K., Yoshida, M., Asada, K., Matsui, T., and Osajima, Y.,** 2000, Antihypertensive effect of Valyl-Tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects, *Journal of Human Hypertension*, 14: 519–523.
- Keidar, S., Kaplan, M. and Gamliel-Lazarovich, A.,** 2007, ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1–7), *Cardiovascular Research*, 73: 463–469.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Kim, J.M., Whang, J.H., and Suh, H.J.,** 2004a, Enhancement of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity and improvement of the emulsifying and foaming properties of corn gluten hydrolysate using ultrafiltration membranes, *European Food Research and Technology*, 218:133–138.
- Kim, J.M., Whang, J.H., Kim, K.M., Koh, J.H. and Suh, H.J.,** 2004b, Preparation of corn gluten hydrolysate with angiotensin I converting enzyme inhibitory activity and its solubility and moisture sorption, *Process Biochemistry*, 39:989–994.
- Kitts, D.D. and Weiler, K.,** 2003, Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery, *Current Pharmaceutical Design*, 9:1309-1323.
- Kolonel, L.N., Hankin, J.H., Whittemore, A.S., Wu, A.H., Gallagher, R.P., Wilkens, L.R., John, E.M., Howe, G.R., Dreon, D.M., West, D.W. & Paffenbarger, R.S.,** 2000, Vegetables fruits legumes and prostate cancer: a multiethnic case-control study, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9: 793- 804.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A.,** 2003, Food-derived Bioactive Peptides – Opportunities for Designing Future Foods, *Current Pharmaceutical Design*, 9:1297-1308.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A.,** 2006, Bioactive peptides: Production and functionality, *International Dairy Journal*, 16:945–960.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Lee, D.H., Kima, J.H., Park, J.S., Choi, Y.J., and Lee, J.S.,** 2004, Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*, *Peptides*, 25:621–627.
- Lee, J-E, Bae, I.Y., Lee, H.G., and Yang, C-H,** 2006, Tyr-Pro-Lys, an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from broccoli (*Brassica oleracea Italica*), *Food Chemistry*, 99: 143–148.
- Li, G.H., Liu, H., Shi, Y.H. and Le, G.W,** 2005, Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37: 219-224.
- Lia, G-H, Lea, G-W, Shia, Y-H, and Shrestha, S.,** 2004, Angiotensin I- converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects, *Nutrition Research*, 24:469–486.
- Makri., E.A. ve Doxastakis G.I.,** 2007, Surface tension of *Phaseolus vulgaris* and *coccineus* proteins and effect of polysaccharides on their foaming properties, *Food Chemistry*, 101: 37-48.
- Mandel, S., Packer, L., Youdim, B.H.M, and Weinreb, O.,** 2005, Proceedings from the ‘Third International Conference on Mechanism of Action of Nutraceuticals’, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16:513–520.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Meisel, H.**, 1997, Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications, *Livestock Production Science*, 50: 125- 138.
- Miguel, M., Alonso, M.J., Salices, M., Aleixandre, A. and López-Fandiño, R.**, 2007, Antihypertensive, ACE-inhibitory and vasodilator properties of an egg white hydrolysate: Effect of a simulated intestinal digestion, *Food Chemistry*, 104: 163-168.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M.A. Miguel, M. Aleixandre, A., Delgado, M.A. and Recio, I.**, 2006, Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk, *International Dairy Journal*, 16: 61-69.
- Mwasaru, M.A., Muhammad, K., Bakar, J., and Che Man, Y.B.**, 1999, Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties, *Food Chemistry* 67: 435-443.
- Mullally, M.M., Meisel, H. and FitzGerald, R.J.**, 1997, Angiotensin-I-converting Enzyme Inhibitory Activities of Gastric and Pancreatic Proteinase Digests of Whey Proteins, *International Dairy Journal*, 7:299-303.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Ortiz-Chao, P., Gómez-Ruiz, J.A., Rastall, R.A., Mills, D., Cramer, R., Pihlanto, A., Korhonen, H. and, Jauregi, P., 2009,** Production of novel ACE inhibitory peptides from β -lactoglobulin using Protease N Amano, *International Dairy Journal*, 19:69-76.
- Osorio-Díaz, P., Bello-Pérez, L.A., Agama-Acevedo, E., Vargas Torres, A., Tovar, J. & Paredes-López, O, 2002,** In vitro digestibility and resistant starch content of some industrialized commercial beans (*Phaseolus vulgaris L.*), *Food Chemistry*, 78: 333-337.
- Otte, J, Shalaby, S.M., Zakora, M., Pripp, A.H., and El-Shabrawy, S.A., 2007,** Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis, *International Dairy Journal*, 17:488-503.
- Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., and Shahiri, H., 2009,** The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera, *Food Chemistry* (basimda).
- Papadimitriou, C.G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S.V., Gomes, A.M., Malcata, F.X. and Alichanidis, E., 2007,** Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, *Food Chemistry*, 105: 647-656.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Patch, C.S., Tapsell, L.C., and Williams, P.G.,** 2005, Overweight Consumers' Salient Beliefs on Omega-3–Enriched Functional Foods in Australia's Illawarra Region, *Journal of Nutrition Education and Behavior.*, 37: 83-89.
- Pedroche, J., Yust, M.M., Girón-Calle, J., Alaiz, M. Millán, F. And Vioque, J.,** 2002, Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with Angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 960-965.
- Pihlanto, A., Akkanen, S., and Korhonen, H.J.,** 2008, ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*), *Food Chemistry*, 109:104–112.
- Quirós, A., Ramosa, M., Muguerza, B., Delgado, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A., and Recio, I.,** 2007, Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*, *International Dairy Journal*, 17: 33-41.
- Quirós, A., Dávalos, A., Lasunción, M.A., Ramosa, M., and Recio, I.,** 2008, Bioavailability of the antihypertensive peptide LHLPLP: Transepithelial flux of HLPLP, *International Dairy Journal*, 18: 279–286
- Quist, E.E., Phillips, R.D., and Saalia, F.K.,** 2009, Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of proteolytic digests of peanut (*Arachis hypogaea* L.) flour, *Food Science and Technology*, 42: 694-699.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Roe, S.**, 2001, Protein Purification Techniques, a practical approach, Oxford University Press, Oxford, 279p.
- Saiga, A., Kanda, K., Wei, Z., Okumura, T., Kaneko, T. and Nishimura, T.**, 2002, Hypotensive Activity of Muscle Protein and Gluten Hydrolysates Obtained By Protease Treatment, Journal of Food Biochemistry, 26: 391-401.
- Saiga, A., Okumura, T., Makihara, T., Katsuta, S., Shimizu, T., Yamada, R., and Nishimura, T.**, 2003, Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides in a Hydrolyzed Chicken Breast Muscle Extract, Journal of Agricultural and Food Chemistry., Vol. 51, No. 6, 1741, 1745.
- Scarafoni, A., Magni, C, and Duranti, M.**, 2007, Molecular nutraceuticals as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health, Trends in Food Science & Technology, 18: 454-463.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., and Korpela, R.**, 2003, A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure lowering effect in hypertensive subjects, American Journal of Clinical Nutrition, 77: 326-330.
- Sipola, M., Finckenberg, P., Vapaatalo, H., Pihlanto-Leppala, A., Korhonen, H., and Korpela, R.**, 2002, Alpha-lactorphin and betalactorphin improve arterial function in spontaneously hypertensive rats, Life Sciences, 71: 1245-1253.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Shuangquan, Tsuda, H. and Miyamoto, T.**, 2008, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with *Lactobacillus helveticus* 130B4 from camel milk in Inner Mongolia, China, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88:2688–2692.
- Stacewicz-Sapuntzakis, M. and Bowen, P.E.**, 2005, Role of lycopene and tomato products on prostate health, *Biochimica and Biophysica Acta*, 1740: 202-205.
- Suh, H.J., Whang, J.H., Kim, Y.S., Bae, S.H. and Noh, D.O.**, 2003, Preparation of angiotensin I converting enzyme inhibitor from corn gluten, *Process Biochemistry*, 38:1239-1244.
- Tang, C-H.**, 2008, Thermal denaturation and gelation of vicilin-rich protein isolates from three *Phaseolus* legumes: A comparative study, *Food Science and Technology* 41: 1380-1388.
- Theodore, A.E. and Kristinsson, H.G.**, 2007, Angiotensin converting enzyme inhibition of fish protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolate, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 2353-2357.
- Urala, N. and Lahteenmaki**, 2004, Attitudes behind consumers' willingness to use functional foods, *Food Quality and Preference*, 15: 793-803.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Ünal**, 2008, Kazeinat veya Peynir Suyu Protein Konsantresi ile Zenginleştirmenin Yoğurdun Duyusal, Biyokimyasal ve Reolojik Özellikleri ile Yoğurt Bakterilerinin Gelişimi Üzerine Etkisi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Süt Teknolojisi Anabilim Dalı, 140s.
- Vercruyse, L., Smaghe, G., Herregods, G., and Van Camp, J.**, 2005, ACE Inhibitory Activity in Enzymatic Hydrolysates of Insect Protein, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5207-5211.
- Vercruyse, L., Smaghe, G., Matsui, T., and Van Camp, J.**, 2008, Purification and identification of an angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the gastrointestinal hydrolysate of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*, *Process Biochemistry*, 43: 900–904.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Devos, L. and Verstraete, W.**, 2003, Release of Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity during in Vitro Gastrointestinal Digestion: from Batch Experiment to Semicontinuous Model, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5680-5687.
- Vermeirssen, V., van der Bent, A., Camp, J., van Amerongen, A. and Verstraete, W.**, 2004, A quantitative in silico analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests, *Biochimie*, 86: 231-239.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Vermeirssen, V., Augustijns, P., Morel, N., Van Camp, J., Opsomer, A., and Verstraete, W.,** 2005, In vitro intestinal transport and antihypertensive activity of ACE inhibitory pea and whey digests, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(6): 415-430.
- Vijayakumari, K., Pugalenti, M. & Vadivel, V.,** 2007, Effect of soaking and hydrothermal processing methods on the levels of antinutrients and in vitro protein digestibility of *Bauhinia purpurea* L. seeds, *Food Chemistry*, 103: 968-975.
- Wang, J., Hu, J., Cui, J., Bai, X., Dua, Y., Miyaguchi, Y. and Lin, B.,** 2008, Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats, *Food Chemistry*, 111: 302-308.
- Whelton, S.P., Hyrea, A.D., Pedersena, B., Yia, Y., Wheltona, P.K., and He, J.,** 2005, Effect of dietary fiber intake on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled clinical trials, *Journal of Hypertension*, 23:475–481.
- Whitney, N.E., Hamilton, E.N., Rolfes, S.R.,** 1990, *Understanding Nutrition*, West Publishing Company, New York.
- Wu, J. and Ding, X.,** 2002, Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides, *Food Research International*, 35: 367-375.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

Xu, B.J. & Chang, S.K.C., 2008, Effect of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes, *Food Chemistry*, 110:1-13.

Yanjun Yang, Y., Marczak, E.D., Usui, H., Kawamura, Y., and Yoshikawa, M., 2004, Antihypertensive Properties of Spinach Leaf Protein Digests, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2223-2225.

Yust, M.M., Pedroche, J., Girón-Calle, J, Alaiz, M, Millón, F. and Vioque, J., 2003, Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase, *Food Chemistry*, 81: 363-369.

Web adresleri

Aydınlı, Fehmi. “Türkiye’ nin Tansiyonunu Ölçüyoruz.” Türkiye’nin Tansiyonu. TC Sağlık Bakanlığı. 25.09.2008
<<http://www.turkiyenintansiyonu.org/doc/FehmiAydinli.pdf>>

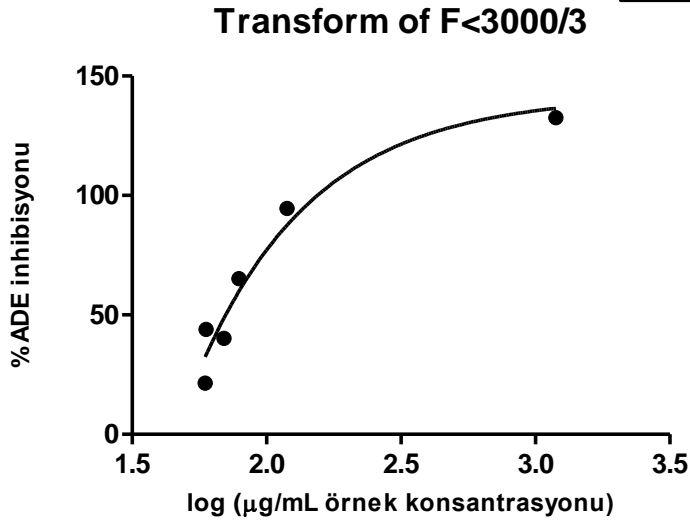
“Chronic Diseases”. World Health Organization. 15.11.2008
<http://www.who.int/topics/chronic_diseases/en/>

<www.nature.com/ajh> 21.10.2008

“Yıllar İtibariyle Sebze Üretimleri (Ton).” Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 20.09.2008
<http://www.tarim.gov.tr/uretim/istatistikler/uretim_istatistikleri/Bitkisel_uretim/turkiye/sebze_turkiye.htm>

Ek 2. Fasulye örneğinin enzimatik hidrolizinden elde edilen MA<3000 Da fraksiyonunun IC₅₀ değerinin hesaplanması

Bottom	141.9
Top	~ -472300
LogIC ₅₀	~ -1.863



$$y = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{x - \log IC_{50}})$$

$$50 = 141,9 + (-472300 - 141,9) / (1 + 10^{x+1,863})$$

$$-91,9 = -472441,9 / (1 + 10^{x+1,863})$$

$$5140,826 = 1 + 10^{x+1,863}$$

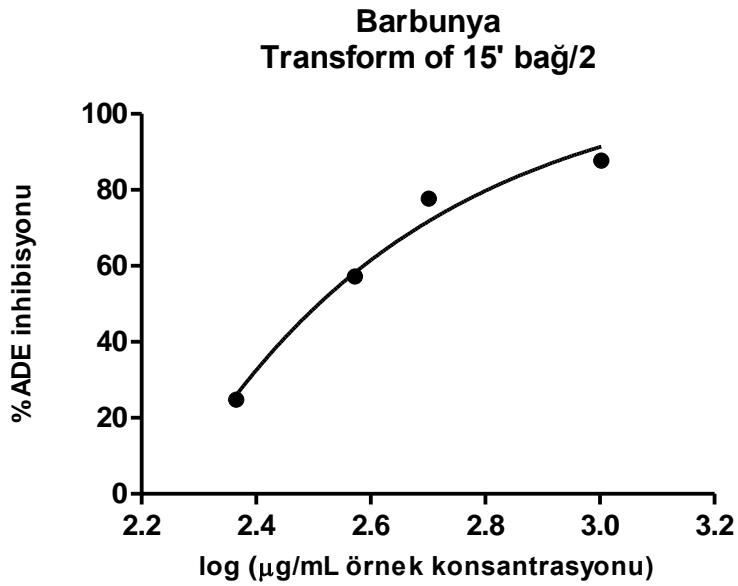
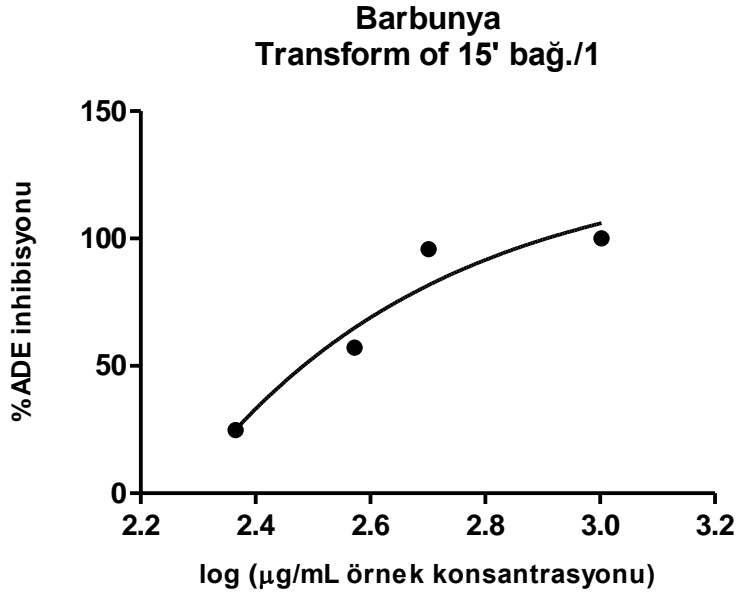
$$5139,826 = 10^{x+1,863}$$

$$\log(5139,826) = x + 1,863$$

$$3,711 - 1,863 = x$$

$$x = 1,8479$$

$$\log[\text{örnek}] = x \rightarrow 10^{1,8479} = 70,46$$

Ek 3. IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi için çizilen doz-inhibisyon eğrileri

ÖZGEÇMİŞ

07.02.1982 tarihinde İzmir’ de doğan Halise Gül AKILLIOĞLU, ilköğrenimini Dokuz Eylül İlköğretim Okulu’ nda tamamladıktan sonra, öğrenimine Yahya Kemal Beyatlı İlköğretim Okulu ve Bornova Çimentaş Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)’ nde devam etmiştir. 2000 yılında Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’ nde okumaya hak kazanmış ve 2004 yılında lisans eğitimini başarıyla tamamlamıştır. Yaklaşık bir buçuk yıl Selçuk Gıda A.Ş’ de Gıda Mühendisi olarak çalıştıktan sonra, 2006 yılında Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’ nda yüksek lisans programına kayıt olmuştur. 2008 yılında Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü’ nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başlamıştır ve hala bu görevini sürdürmektedir.