

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYAZ DUT (*Morus alba L.*) VE YAPRAKLARINDAN ELDE EDİLEN PROTEİN
EKSTRAKTLARININ VE FRAKSİYONLARININ BİYOAKTİF
ÖZELLİKLERİNİN (ACE-İNHİBİSYON VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİ)
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma Tuba PİRİNÇ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Didem ŞAHİNGİL

OCAK 2020

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

**BEYAZ DUT (*MORUS ALBA L.*) VE YAPRAKLARINDAN ELDE EDİLEN
PROTEİN EKSTRAKTLARININ VE FRAKSİYONLARININ BİYOAKTİF
ÖZELLİKLERİNİN (ACE-İNHİBİSYON VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ)
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ DİDEM ŞAHİNGİL

HAZIRLAYAN

FATMA TUBA PİRİNÇ

Jürimiz tarafından 10/01/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda bu tez oybirliği /oyçokluğu ile başarılı bulunarak Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul etmiştir.

Jüri Üyelerinin Unvanı Adı Soyadı

1. Dr. Öğr. Üyesi Didem ŞAHİNGİL
2. Prof. Dr. Ali Adnan HAYALOĞLU
3. Prof. Dr. Mehmet AKBULUT

İmza

.....
.....
.....

O N A Y

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../20... tarih ve 20.../..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Kazım TÜRK

Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında yardım, öneri, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgmeden beni her konuda yönlendiren ve bu zorlu süreci tamamlamamda büyük katkısı olan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Didem ŞAHİNGİL'e ve değerli hocam Prof. Dr. Ali Adnan HAYALOĞLU'na;

Deneysel çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü LAB 315 grubunda bulunan değerli arkadaşlarıma;

Tezin uygulama aşamasında FYL-2018-1166 No'lu proje ile araştırmama vermiş oldukları maddi ve manevi destekten dolayı, İnönü Üniversitesi BAP birimine;

Bursa Teknik Üniversitesi'nde birlikte görev yaptığım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Adnan Fatih DAĞDELEN'e ve bütün çalışma arkadaşlarıma;

Tez yazımı süresince bana destek olan sevgili arkadaşım Uzman Dr. Hesna Gül ÇELER'e;

Bu günlere gelmemde en büyük katkısı olan, karşılaştığım tüm zorluklarda yanımda yer alarak beni her açıdan destekleyen, sonsuz özveri ve fedakarlık gösteren, hayatımın her basamağında desteklerini ve sevgilerini hissettiğim canım aileme;

Sadece hayatımda var olmasıyla bile hayatımı anlamlı kılan, evimin neşesi biricik oğlum Yusuf Talha Pirinç'e;

Tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Beyaz dut (*Morus alba L.*) ve yapraklarından elde edilen protein ekstraktlarının ve fraksiyonlarının biyoaktif özelliklerinin (ACE-inhibisyon ve antioksidan aktiviteleri) belirlenmesi**” başlıklı bu çalışmamın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Fatma Tuba PİRİNÇ



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ	i
ONUR SÖZÜ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Dut ve Dut Yaprağı.....	4
2.2. Proteinler.....	6
2.3. Proteinlerin Ekstraksiyonu.....	7
2.3.1. İzoelektrik noktada çöktürme.....	7
2.3.2. Nötral tuzlarla çöktürme.....	9
2.4. Proteinlerin Hidrolizi Ve Biyoaktif Peptitlerin Oluşumu	9
2.4.1. Gastrointestinal sistem	10
2.4.2. Enzimatik hidroliz	11
2.4.3. Fermentasyon	12
2.5. Biyoaktif Peptitler Üzerine Isıl İşlemin Etkisi.....	13
2.6. Biyoaktif Peptitlerin Türleri.....	14
2.6.1. ACE inhibitörü peptitler.....	15
2.6.2. Antioksidatif peptitler	18
2.6.3. Diğer biyoaktif peptitler	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	24
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Ön denemeler: izoelektrik noktanın belirlenmesi	24
3.2.2. Protein ekstraksiyonu	25
3.2.2.1. Isıl işlem uygulanan örneklerle protein ekstraksiyonu uygulaması.....	25
3.2.2.2. Isıl işlem uygulanmayan örneklerle protein ekstraksiyonu uygulaması.....	29
3.2.2.3. Protein ekstraksiyon veriminin hesaplanması	29
3.2.3. Proteinlerin enzimatik hidrolizasyonu	29
3.2.3.1. Enzim seçimi	30
3.2.3.2. Seçilen enzimle protein ekstraktlarına hidrolizasyon işleminin uygulanması	30
3.2.4. Hidrolizatların fraksiyonlarına ayrılması	32
3.2.5. Analizler.....	32
3.2.5.1. Fizikokimyasal analizler.....	34
3.2.5.2. Kadmiyum- ninhidrin metodu	34
3.2.5.3. ACE inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi.....	35
3.2.5.3.1. IC ₅₀ değerinin belirlenmesi	36
3.2.5.3.2. Çözünür protein miktarının belirlenmesi	36
3.2.5.4. Antioksidan aktivitesinin belirlenmesi	37
3.2.5.4.1. ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit)) radikal kasyonlarını süpürme analizi.....	37

3.2.5.4.1. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme analizi.....	38
3.2.6. İstatistiksel analizler.....	39
4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	40
4.1. Fizikokimyasal Analizler.....	40
4.2.Ön Denemeler: İzoelektrik Noktanın Belirlenmesi	41
4.3.Protein Ekstraksiyon Veriminin Belirlenmesi	43
4.4. Protein Hidrolizasyon Veriminin Belirlenmesi	46
4.4.1. Enzim seçimi.....	46
4.4.2. Pepsin hidrolizatlarının toplam serbest amino asit miktarlarının belirlenmesi ..	49
4.5. ACE İnhibisyon Aktivitesi.....	52
4.5.1. Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının ACE inhibisyon aktivitesi	52
4.5.2. Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının ACE inhibisyon aktivitesi	55
4.5.3. Dut ve dut yaprağı protein fraksiyonlarının (MA < 10 kDa ve MA < 3kDa) ACE inhibisyon aktivitesi	58
4.5.3.1. 10 kDa altı fraksiyonların (MA < 10kDa) ACE inhibisyon aktivitesi	58
4.5.3.2. 3kDa altı fraksiyonların (MA <3 kDa) ACE inhibisyon aktivitesi	60
4.5.4. IC ₅₀ değerinin belirlenmesi	67
4.5.4.1. Dut örneğinin (d50h) IC ₅₀ değerinin belirlenmesi	67
4.5.4.2. Dut yaprağı örneğinin (dy50h) IC ₅₀ değerinin belirlenmesi.....	68
4.6. Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi.....	69
4.6.1. ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit)) radikal katyonlarını süpürme analizi	69
4.6.1.1. Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının ABTS antioksidan aktivitesinin belirlenmesi	69
4.6.1.2. Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının ABTS antioksidan aktivitesinin belirlenmesi	72
4.6.2. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme analizi	75
4.6.2.1. Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının DPPH antioksidan aktivitesinin belirlenmesi	75
4.6.2.2.Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının DPPH antioksidan aktivitesinin belirlenmesi	77
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
6. KAYNAKLAR.....	82
7.EKLER	94

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1:	Dut ve dut yaprağı besin değerleri	5
Çizelge 2.2:	Bitkisel kaynaklardan elde edilen ACE inhibitörü peptitlerin elde edildiği kaynaklar, hidrolizasyonda kullanılan enzimler ve IC_{50} değerleri.....	17
Çizelge 2.3:	Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen antioksidatif peptitlere ait hidrolizasyonda kullanılan enzimler, mikroorganizmalar ve analiz metodları	20
Çizelge 2.4:	Bazı biyoaktif peptitler, elde edildikleri gıda kaynakları ve fizyolojik olarak etki ettikleri fonksiyonlar	21
Çizelge 4.1:	Dut ve dut yaprağı örneklerinin fizikokimyasal özellikleri	40
Çizelge 4.2:	Dut ve dut yaprağı örneklerinin farklı pH' larda % çözünürlük değerleri.....	41
Çizelge 4.3:	Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının % çözünür protein değerleri.....	43
Çizelge 4.4:	Farklı enzimlerle hidrolize edilen ekstraktların hidrolizasyon verimleri.....	46
Çizelge 4.5:	Pepsinle hidrolize edilen örneklerin toplam serbest amino asit miktarları.....	49
Çizelge 4.6:	Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının % ACE inhibisyon değerleri.....	52
Çizelge 4.7:	Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının % ACE inhibisyon değerleri.....	55
Çizelge 4.8:	MA <10 kDa olan dut ve dut yaprağı protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon değerleri	58
Çizelge 4.9:	MA <3 kDa olan dut ve dut yaprağı protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon değerleri	60
Çizelge 4.10:	Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının abts antioksidan aktivitesi değerleri	69
Çizelge 4.11:	Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri	72
Çizelge 4.12:	Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri	75
Çizelge 4.13:	Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1:	70°C’de, farklı sürelerde ısıtıl işlem uygulanan peynir altı suyu proteinlerinin pH-çözünürlük profili	8
Şekil 2.2:	Biyoaktif peptitlerin faydalı aktiviteleri	15
Şekil 2.3:	Vücutta kan basıncının kontrol edilmesini sağlayan mekanizmalar	16
Şekil 3.1:	Çözünür protein miktarı için BSA kalibrasyon grafiği	25
Şekil 3.2:	Isıl işlem uygulanan örnekler için protein ekstraktı eldesi akım şeması	29
Şekil 3.3:	Protein hidrolizatı eldesi akım şeması	31
Şekil 3.4:	Analiz Planlaması	33
Şekil 3.5:	Lösün standardının farklı konsantrasyon değerlerine karşılık absorbans değerleriyle çizilen kalibrasyon eğrisi	35
Şekil 3.6:	BSA çözeltisinin farklı konsantrasyon değerlerine karşılık absorbans değerleriyle çizilen kalibrasyon eğrisi	37
Şekil 4.1:	Dut örneklerinin farklı pH değerlerinde % çözünürlük grafiği	42
Şekil 4.2:	Dut yaprağı örneklerinin farklı pH değerlerinde % çözünürlük grafiği...	42
Şekil 4.3:	Dut protein ekstraktlarının % çözünür protein değerleri	44
Şekil 4.4:	Dut yaprağı protein ekstraktlarının % çözünür protein değerleri	45
Şekil 4.5:	Farklı enzimlerle hidrolize edilen dut ekstraktlarının hidrolizasyon verimleri	47
Şekil 4.6:	Farklı enzimlerle hidrolize edilen dut yaprağı ekstraktlarının hidrolizasyon verimleri	48
Şekil 4.7:	Pepsinle hidrolize edilen dut örneklerinin toplam serbest amino asit miktarları	50
Şekil 4.8:	Pepsinle hidrolize edilen dut yaprağı örneklerinin toplam serbest amino asit miktarları	51
Şekil 4.9:	Dut protein ekstraktlarının ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	53
Şekil 4.10:	Dut yaprağı protein ekstraktlarının ACE inhibisyon aktivitesi değerleri	54
Şekil 4.11:	Dut protein hidrolizatlarının % ACE inhibisyon aktivitesi	56
Şekil 4.12:	Dut yaprağı protein hidrolizatlarının % ACE inhibisyon aktivitesi	57
Şekil 4.13:	MA <10kDa olan dut protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesi.....	59
Şekil 4.14:	MA <10kDa olan dut yaprağı protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesi	60
Şekil 4.15:	MA <3kDa olan dut protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesi	61
Şekil 4.16:	MA <3kDa olan dut yaprağı protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesi	62
Şekil 4.17:	% ACE inhibisyon analizi yapılan bütün dut örneklerinin beraber değerlendirilmesi	65
Şekil 4.18:	% ACE inhibisyon analizi yapılan bütün dut yaprağı örneklerinin beraber değerlendirilmesi	66
Şekil 4.19:	Dut örneğinin (d50h) IC ₅₀ değerinin belirlenmesine ait grafik	67
Şekil 4.20:	Dut yaprağı örneğinin (dy50h) IC ₅₀ değerinin belirlenmesine ait grafik	68
Şekil 4.21:	Dut protein ekstraktlarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri	70
Şekil 4.22:	Dut yaprağı protein ekstraktlarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri	71
Şekil 4.23:	Dut protein hidrolizatlarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri	73

Şekil 4.24:	Dut yaprağı protein hidrolizatlarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri	74
Şekil 4.25:	Dut protein ekstraktlarının DPPH antioksidan aktivitesi değerleri	76
Şekil 4.26:	Dut yaprağı protein ekstraktlarının DPPH antioksidan aktivitesi değerleri	76
Şekil 4.27:	Dut protein hidrolizatlarının DPPH antioksidan aktivitesi değerleri	78
Şekil 4.28:	Dut yaprağı protein hidrolizatlarının DPPH antioksidan aktivitesi değerleri	78



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	: Anjiontensine converting enzyme
HHL	: Hippuryl-histidyl-leucine
BSA	: Bovine serum albumin
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
HHL	: Hippuryl--histidyl-leucine
IC_{50}	: %50 inhibitör madde konsantrasyonu
TSAA	: Toplam serbest amino asit miktarı
ABTS	: (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit)) solüsyonu
Cd-	: Cadmium ninhydrin
Ninhidrin	
MA	: Molekül ağırlığı
cap	: Captopril
aa	: Askorbik asit
ABS	: Absorbans
Leu	: Leucine
de	: Isıl işlem uygulanmayan dut örneğinin protein ekstraktı
d50e	: 50°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin protein ekstraktı
d60e	: 60°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin protein ekstraktı
d70e	: 70°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin protein ekstraktı
d80e	: 80°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin protein ekstraktı
d90e	: 90°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin protein ekstraktı
dh	: Isıl işlem uygulanmayan dut örneğinin protein hidrolizatı
d50h	: 50°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin protein hidrolizatı
d60h	: 60°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin protein hidrolizatı
d70h	: 70°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin protein hidrolizatı
d80h	: 80°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin protein hidrolizatı
d90h	: 90°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin protein hidrolizatı
dh3	: Isıl işlem uygulanmayan dut örneğinin MA<3kDa fraksiyonu
d50h3	: 50°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin MA<3kDa fraksiyonu
d60h3	: 60°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin MA<3kDa fraksiyonu
d70h3	: 70°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin MA<3kDa fraksiyonu
d80h3	: 80°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin MA<3kDa fraksiyonu
d90h3	: 90°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin MA<3kDa fraksiyonu
dh10	: Isıl işlem uygulanmayan dut örneğinin MA<10kDa fraksiyonu
d50h10	: 50°C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin MA<10kDa fraksiyonu
d60h10	: 60 °C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin MA<10kDa fraksiyonu
d70h10	: 70 °C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin MA<10kDa fraksiyonu
d80h10	: 80 °C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin MA<10kDa fraksiyonu
d90h10	: 90 °C'de ısıl işlem uygulanan dut örneğinin MA<10kDa fraksiyonu
kdy	: Kuru dut yaprağı (işlem uygulanmadı)
dye	: Isıl işlem uygulanmayan dut yaprağı örneğinin protein ekstraktı
dy50e	: 50°C'de ısıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin protein ekstraktı
dy60e	: 60°C'de ısıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin protein ekstraktı
dy70e	: 70°C'de ısıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin protein ekstraktı
dy80e	: 80°C'de ısıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin protein ekstraktı
dy90e	: 90°C'de ısıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin protein ekstraktı
dyh	: Isıl işlem uygulanmayan dut yaprağı örneğinin protein hidrolizatı
dy50h	: 50°C'de ısıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin protein hidrolizatı

dy60h : 60°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin protein hidrolizati
dy70h : 70°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin protein hidrolizati
dy80h : 80°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin protein hidrolizati
dy90h : 90°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin protein hidrolizati
dyh3 : Isıl işlem uygulanmayan dut yaprağı örneğinin MA<3kDa fraksiyonu
dy50h3 :50°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin MA<3kDa fraksiyonu
dy60h3 : 60°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin MA<3kDa fraksiyonu
dy70h3 : 70°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin MA<3kDa fraksiyonu
dy80h3 : 80°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin MA<3kDa fraksiyonu
dy90h3 : 90°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin MA<3kDa fraksiyonu
dyh10 : Isıl işlem uygulanmayan dut yaprağı örneğinin MA<10kDa fraksiyonu
dy50h10 :50°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin MA<10kDa fraksiyonu
dy60h10 :60°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin MA<10kDa fraksiyonu
dy70h10 :70°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin MA<10kDa fraksiyonu
dy80h10 :80°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin MA<10kDa fraksiyonu
dy90h10 :90°C'de ısıtıl işlem uygulanan dut yaprağı örneğinin MA<10kDa fraksiyonu

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BEYAZ DUT (*Morus alba L.*) VE YAPRAKLARINDAN ELDE EDİLEN PROTEİN EKSTRAKTLARININ VE FRAKSİYONLARININ BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN (ACE-İNHİBİSYON VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ) BELİRLENMESİ

Fatma Tuba PİRİNÇ

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

94+ XI sayfa

2020

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Didem ŞAHİNGİL

Biyoaktif peptitler, gıdaların yapısındaki proteinlerin içinde inaktif halde iken enzimatik hidroliz, fermentasyon ve ısıl işlem gibi proseslerle aktifleşen bileşiklerdir. Bu sebeple çalışmada kullanılan kuru dut ve kuru dut yaprağı örneklerine ısıl işlem ve enzimatik hidroliz uygulanarak proteinlerin Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibisyon aktivitesi ve antioksidan kapasitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Protein ekstraktlarını maksimum verimle elde edebilmek için izoelektrik nokta (pH:9) ve alkali özütleme noktası (pI:5) belirlenmiş ve ekstraksiyon bu parametrelerle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlar; pepsin, tripsin, kimotripsin ve alkalaz enzimleri ile hidrolize edilmiş ve en yüksek hidroliz veriminin pepsinle olduğu tespit edilmiştir. Proteinlerin hidrolizinden sonra, peptitleri molekül büyüklüklerine göre ayırmak amacıyla 10 kDa ve 3 kDa membranları kullanılmıştır. Dut örnekleri içinde istatistiksel olarak en yüksek ACE inhibisyon aktivitesinin 50°C’ de ısıl işlem uygulanan örneğin ekstrakt ve hidrolizatlarına ait olduğu görülmektedir (IC₅₀: 0.061mg /mL). Ayrıca bu örneğin molekül ağırlığı 3kDa altındaki fraksiyonun, 10 kDa altındaki fraksiyondan daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Diğer örnekler ile kıyaslandığında sıcaklık şiddeti arttıkça ACE inhibisyon aktivitesinin azaldığı ve en düşük aktivitenin 90°C’ de ısıl işlem uygulanan örneğe ait olduğu belirlenmiştir. Antioksidan kapasitesi açısından dut örnekleri kıyaslandığında antihipertansif etkinin aksine sıcaklık şiddeti arttıkça antioksidan kapasitenin arttığı ve en yüksek aktivitenin 90°C’de hidrolize edilen örneğe ait olduğu belirlenmiştir. Dut yaprağı sonuçlarına göre en yüksek ACE inhibisyon aktivitesinin 50°C’ de ısıl işlem uygulanan örneğin ekstrakt ve hidrolizatlarına ait olduğu görülmektedir (IC₅₀: 0.107 mg/mL). Diğer dut yaprağı örnekleri ile kıyaslandığında sıcaklık şiddeti arttıkça ACE inhibisyon aktivitesinin azaldığı ve en düşük aktivitenin 90°C’de hidrolize edilen örneğe ait olduğu belirlenmiştir. Antioksidan kapasitesi açısından dut yaprağı örnekleri kıyaslandığında antihipertansif etkiyle benzer şekilde sıcaklık şiddeti arttıkça antioksidan kapasitenin azaldığı görülmüştür. Çalışma sonunda kuru dut ve kuru dut yaprağı ile kıyaslandığında örneklere uygulanan ısıl işlem ve enzimatik hidroliz işlemlerinin, ACE inhibisyon ve antioksidan aktiviteyi artırmada etkili olduğu bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Beyaz dut (*Morus Alba L.*), ACE inhibisyonu, Biyoaktif peptitler, Antihipertansif etki, Antioksidan etki

ABSTRACT

Master Thesis

IDENTIFICATION OF BIOACTIVE PROPERTIES (ACE-INHIBITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES) OF PROTEIN EXTRACTS AND FRACTIONS FROM WHITE MULBERRY (*Morus alba L.*) AND LEAVES

Fatma Tuba PIRINC

Inonu University
Graduate School of Nature and Applied Sciences
Department of Food Engineering

94+ XI pages

2020

Supervisor: Assistant Professor Didem SAHINGIL

Bioactive peptides are activated by processes such as enzymatic hydrolysis, fermentation and heat treatment while they are inactive within the proteins in the structure of foods. For this reason, it was aimed to investigate the effects of proteins on Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition activity and antioxidant capacity by applying heat treatment and enzymatic hydrolysis to dry mulberry and dry mulberry leaf samples used in the study. The isoelectric point (pH:9) and alkaline extraction point (pI:5) were determined to obtain the protein extracts with maximum efficiency and the extraction was performed with these parameters. The extracts were hydrolyzed by pepsin, trypsin, chymotrypsin and alkalase enzymes and the highest hydrolysis yield was determined by pepsin. After hydrolysis of proteins, 10 kDa and 3 kDa membranes were used to separate peptides according to their molecular size. The values showing statistically the highest ACE inhibition activity in mulberry samples belong to the extraction and hydrolysates of the sample heated at 50°C (IC₅₀: 0.061mg/mL). Furthermore, it was determined that the fraction below molecular weight 3kDa showed higher activity than the fraction below 10 kDa. It was determined that ACE inhibition activity decreased as temperature intensity increased compared to other samples and that the lowest activity belonged to the sample heated at 90 ° C. In terms of antioxidant capacity, it was determined that unlike the antihypertensive effect of mulberry samples, the antioxidant capacity increased as the temperature intensity increased and the highest values belonged to the sample hydrolyzed at 90°C. According to mulberry leaf results, the values showing the highest ACE inhibition activity belong to the extraction and hydrolysates of the sample heated at 50°C (IC₅₀: 0.107 mg/mL). When compared to other mulberry leaf samples, ACE inhibition activity decreased as the temperature intensity increased and the lowest activity belonged to the sample hydrolyzed at 90°C. In terms of antioxidant capacity, it was observed that the antioxidant capacity decreased as the temperature intensity increased compared to mulberry leaf samples. At the end of the study, heat treatment and enzymatic hydrolysis applications were found to be beneficial in increasing ACE inhibition and antioxidant activity when compared to dry Mulberry and dry mulberry leaf samples.

KEY WORDS: White mulberry (*Morus Alba L.*), ACE inhibition, Bioactive peptides, Antihypertensive effect, Antioxidant effect

1.GİRİŞ

Dut meyvesi; içeriğinde bulunan sindirilebilir protein, karbonhidrat, mikro ve makro besin öğeleri, polifenoller, serbest amino asit ve organik asitler, fitokimyasallar, monoterpenler, polifenoller (flavonol ve antosiyanin) içermesi bakımından zengin besinler arasında görülmektedir (Srivastava vd., 2006; Gryn-Rynko vd., 2016).

Moracea familyasının *Morus* cinsinin *Morus alba L.* türünü oluşturan dut bitkisinin ülkemizde yaygın olarak yetişen 3 türü bulunmaktadır. Bunlar beyaz dut (*M. alba*), kara dut (*M. nigra*) ve mor dut (*M. rubra*) dır. Bu üç dut türü içerisinde en yaygın ve ağaç sayısı en fazla olanı beyaz duttur (Khan vd., 2019).

Ülkemizde üretilen dut meyvesi yeterince değerlendirilememekte ve hasat dahi edilemeden dökülüp israf olmaktadır. TUIK'in "Bitkisel Ürün Denge Tabloları; Meyveler, Sert Kabuklular ve İçecek Bitkileri" verilerine göre 2017-2018 piyasa yılı dut üretimi 74.383 tondur ve dut meyvesinin pazarlanma oranı % 8.94 düzeyinde kalmıştır (Anonim, 2018). Hasat edilen dutların çok az bir kısmı taze olarak tüketilmekte veya meyve suyu, şarap ve reçel gibi ürünlere işlenmektedir (Zhang vd., 2018). Önemli miktarı ise tazeyken yumuşak olan meyvenin nakledilme güçlüğü ve yüksek nem içeriğinden dolayı (~%80) (Yang vd., 2010) muhafaza etmenin zor olması nedeniyle kurutulmaktadır ve geri kalanı pekmez, pestil, cevizli sucuk, dut ezmesi gibi geleneksel ürünlere işlenerek değerlendirilmektedir.

Dut meyvesinin protein içeriği % 4.72-9.96 aralığında değişirken, dut yaprağının protein içeriği ise % 15.31-30.9 aralığında bulunmaktadır. Dut meyvesi önemli miktarda biyoaktif bileşenler içerdiğinden dolayı geleneksel tıpta da kullanılmaktadır (Srivastava vd., 2006; Zhang vd., 2018).

Biyoaktif bileşenler, fizyolojik ve hücrel aktiviteri etkileyerek sağlık üzerine olumlu etkiler sağlayan ikincil metabolitlerdir. Biyoaktif bileşenler gıdalarda genellikle az miktarlarda bulunsalar da, sağlık üzerinde ciddi etkilere sahiptirler (Puri, 2017).

Biyoaktif bileşenlerin bir türü de biyoaktif peptitlerdir. Biyoaktif peptitler her molekülünde genellikle 2 ila 20 aminoasit kalıntısı bulunduran kısa peptitlerdir (Pritchard vd., 2010). Bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteinlerin içinde inaktif olan ancak sindirim sırasında enzimatik hidrolizle veya fermentasyon ve ısı işlem gibi proseslerle aktifleşen,

fizyolojik olarak pek çok faydası bulunan biyoaktif peptitler oluşur (Korhonen, 2009; Kınık ve Gürsoy, 2002).

Bu peptitlerin biyolojik aktivitesi antimikrobiyal etki, kan basıncını düşürücü etki (Anjiotensin-I Converting Enzyme (ACE) inhibitörü), kolesterol düşürücü etki, antitrombotik ve antioksidan etki, mineral absorpsiyonu/biyoyararlılığını artırma, immunomodülatör ve opioid etkiler olarak sıralanabilmektedir (Moslehisad vd., 2013).

Dünya genelinde biyoaktif peptitlerin pazarı, tüketicilerin fonksiyonel gıdalar/sağlıklı gıdalar ve sağlık arasındaki olumlu ilişki hakkında artan farkındalık nedeniyle sürekli olarak büyümektedir (Chalamaiah vd., 2019). Protein kaynağı olarak bilinen hayvansal ürünlerin kısıtlı ve pahalı olması ve vejetaryen eğilimlerin artması da bitki proteinlerine olan ilgiyi artırmaktadır.

Doğal ürünler her zaman biyoaktif peptitlerce zengin kaynaklar olmuştur. Bu bileşenler özellikle meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunmakla birlikte yüksek tansiyonu önleyici ve antioksidan özellikler gibi sağlığa yararlı aktivitelerinden dolayı bu gıdalara duyulan ilgi günden güne artmaya başlamıştır.

Yüksek tansiyonun önlenmesi ve tedavisinde meyve sebze tüketiminin artırılıp düşük yağlı süt ürünlerinin kullanıldığı diyet programlarının daha etkili olduğu belirtilmiştir (Appel vd., 1997). Dünya çapında ciddi bir sağlık sorunu oluşturan hipertansiyonun engellenmesinde beslenme faktörü oldukça önemli bir role sahiptir. Yapılan çalışmalar antihipertensif peptitleri taşıyan gıdaların tüketilmesiyle kan basıncında önemli oranda düşme olduğunu göstermiştir, bu yüzden antihipertensif aktiviteye sahip ACE inhibitörü bileşenlerin üretimi gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Tavares vd., 2011; Akpınar ve Uysal, 2013).

Vücutta yüksek ve düşük tansiyonun düzenlenmesini kontrol eden biyokimyasal birçok mekanizma vardır. En çok bilinen kan basıncı düzenleyicilerden ilki renin-anjiotensin sistemi (RAS) ile ilişkilendirilmektedir (Saleh vd., 2016).

Buna göre; anjiyotensinojenin renin ile hidrolizi sonucu inaktif bir peptit olan Anjiyotensin I oluşur ve Anjiyotensin dönüştürücü enzimin (ACE), Anjiyotensin I ' in karboksil ucundaki iki amino asidi ayırması ile damar daraltıcı (vazokonstriktör) özelliği olan Anjiyotensin II meydana gelir. (Saleh vd., 2016; Pihlanto vd., 2010).

İkinci sistem olarak ise ACE, damar genişletici (vasodilative) aktivite gösteren bradykinin enzimini parçalar. ACE inhibitörü peptitler ise ACE'yi inhibe edip bu sistemi bloke ederek kan basıncını düzenlemektedir (Patten vd., 2016; Akpınar ve Uysal, 2013). ACE'nin inhibe edilmesi antihipertansif etkiye neden olmaktadır.

Biyolojik olarak aktivite gösteren peptitlerin bir türü de antioksidan peptitlerdir. Son zamanlarda, gıda kaynaklı antioksidan peptitlere olan ilgi ve bu peptitlerin oksidatif stresi önlediğine dair kanıtlar artmıştır (Moslehisad vd., 2013). Antioksidanlar, radikallerin oluşumunu önleyerek, radikalleri veya hidrojen peroksit ve diğer peroksitleri temizleyerek işlev görebilir (Pihlanto, 2006).

Oksidatif stresle kanser, diyabet, eklem iltihabı, Alzheimer gibi pek çok hastalık ve rahatsızlıklar arasında bir bağlantı bulunmaktadır. Antioksidanlarca zengin gıdaların tüketilmesi ile oksidatif stresin azaltılabileceği belirtilmektedir (Chakrabarti vd., 2014).

Beyaz dut (*Morus alba L.*) ve yapraklarından elde edilen protein ekstraktları, hidrolizatları ve fraksiyonlarının biyoaktif özelliklerinin (ACE-inhibisyon ve antioksidan aktiviteleri) belirlenmesi bu tezin konusunu oluşturmaktadır. Çalışmamızda kuru dut ve kuru dut yaprağı örneklerine ısı işlem ve farklı proteolitik enzimler uygulanarak proteinlerin ACE inhibisyon aktivitesi ve antioksidan kapasitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Buna göre örneklere farklı sıcaklıklarda ısı işlem uygulanarak (50°C, 60°C, 70°C, 80°C ve 90°C) biyoaktivitenin artma-azalma durumu incelenmiştir. Protein ekstraktlarını maksimum verimle elde edebilmek için ön denemeler sonucunda izoelektrik nokta ve alkali özütleme parametreleri belirlenmiş ve ekstrakt üretimi belirlenen parametrelerle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlara farklı enzimler kullanılarak (pepsin, tripsin, kimotripsin, alkalaz) enzimlerin maksimum aktivite ve stabilite gösterdikleri pH ve sıcaklıkta hidroliz işlemi gerçekleştirilmiş ve yüzde olarak en yüksek hidrolizasyon veriminin hangi enzimle olduğu tespit edilmiştir. Karar verilen enzimle hidrolize edilen örneklere ACE inhibisyon ve antioksidan aktivite analizleri yapılmıştır. Proteinlerin hidrolizinden sonra, hidrolizatlardaki farklı büyüklükte bulunan peptitleri fraksiyonalize etmek amacıyla ultrafiltrasyon membran (10 kDa ve 3 kDa) kullanılmış ve fraksiyonlara ACE inhibisyon analizi yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Dut ve Dut Yapağı

Moracea familyasının *Morus* cinsinin *Morus alba L.* türünü oluşturan beyaz dut bitkisi coğrafi, iklim ve toprak koşulları açısından değerlendirildiğinde dünya üzerinde geniş bir yelpazede yetiştirildiği görülmektedir. Dut ağacı yaprakları ipek böcekçiliğinde kullanılırken meyvesi ise lezzeti, zengin besin içeriği ve düşük kalorili yapısıyla dünyada değerli besinlerden biri olarak kabul edilmiştir (Khan vd., 2019).

Farklı Hint tariflerinde dut yapraklarının “curry , saag, pakoda, paratha ve dhokla” isimleriyle ve baharat hazırlığında da kullanıldığı bildirilmiştir (Srivastava vd., 2006). Ana vatanı Çin olan beyaz dut bitkisi ülkemizde de geniş bir dağılım göstermektedir.

Ülkemizde yaygın olarak yetişen 3 farklı dut türü bulunmaktadır. Bunlar beyaz dut (*M. alba*), kara dut (*M. nigra*) ve mor dut (*M. rubra*) dır. Bu üç dut türü içerisinde en yaygın ve ağaç sayısı en fazla olanı beyaz duttur. Dut toprak ve iklim koşulları açısından bakıldığında seçici olmadığından dolayı ülkemizin hemen hemen her ilinde yetiştirilmektedir. Ülkemizde yetiştiriciliği yapılan ipek böcekçiliğinde tek gıda dut yapağı olduğu için dut ağacının ülke ekonomisinde önemli bir yeri vardır (Budak, 2015).

Dut meyvesinin protein içeriği %4.72-9.96'dır (Srivastava vd., 2006). Dut meyveleri fitokimyasallar, monoterpenler, polifenoller (flavonol ve antosiyanin) içermesi bakımından zengin meyveler arasında görülmektedir. Beyaz dut yaprakları önemli miktarlarda sindirilebilir protein, karbonhidrat, mikro ve makro besin öğeleri, polifenoller, serbest amino asit ve organik asit içermektedir (Gryn-Rynko vd., 2016).

Dut ve dut yapağının besin değerleri Çizelge 2.1'de belirtilmiştir (Turkomp, www.turkomp.gov.tr; Al-Kirshi vd., 2009).

Çizelge 2.1: Dut ve dut yaprağı besin değerleri.

Bileşen	Beyaz Dut (Kuru)	Beyaz Dut (taze)	Kuru Dut Yaprağı
Su	9.55	83.06	10.7 g
Kül	3.10	0.74	11.81 g
Protein	2.76	0.56	29.8 g
Yağ toplam	0.84	0.49	5.57 g
Lif, toplam diyet	8.92 g	2.16 g	11.10 g
Fosfor	121 mg	35 mg	0.28 g
Kalsiyum	376 mg	84 mg	2.73 g
Karbonhidrat	74.83 g	12.99 g	
Glukoz	18.95 g	4.31 g	
Fruktoz	19.25 g	4.54 g	
Demir	9.44 mg	1.05 mg	

Sonuçlar 100 gram üzerinden verilmiştir.

Kuru dut yaprağı önemli miktarda protein (%15.31-30.91) içermektedir (Srivastava vd., 2006). Dut yaprakları en belirgin serbest amino asitler olarak treonin, arginin, asparagin, serin ve glutamin içermektedir (Urbanek Krajnc vd., 2019). Dut yaprağı tozu ateş, boğaz ağrısı, öksürük semptomlarını azaltmaya çalışır, karaciğeri korur, görme yeteneğini geliştirir ve kan basıncını düşürür (Gryn-Rynko vd., 2016).

Yem olarak kullanılmak üzere farklı zamanlarda (ilkbahar ve sonbahar) toplanan dut yapraklarının beslenme değerlerinin araştırıldığı bir çalışmada protein içeriklerinin mevsimsel farklılıkla çok değişmediği (ilkbahar: %21.1 ve sonbahar: %20.9), aynı şekilde amino asit içeriklerinin de benzer olduğu (ilkbahar: %70.0 - 81.6 / ham proteinde ve sonbahar: 75.6 - 78.0 /ham proteinde) ortaya konulmuştur (Yao vd., 2000).

Dut yaprağı ipek böceği beslenmesinde kullanıldığı gibi yüksek oranda sindirilebilirliği ve iyi protein içeriği nedeniyle hayvanların ve balıkların beslenmesinde kullanılmaya uygundur. Ayrıca dut yaprakları ülkemizde ve dünyada sebze olarak da değerlendirilmektedir. Dut yaprağı çayı, yeşil çaydan on kat daha fazla gamma-aminobutylic asit içermesinden dolayı kan basıncını düşürmekte ve sakinleştirici etkiye sahiptir. İçeriğinde bulunan deoxynojirimycin (DNJ) maddesi ile kan şekeri seviyesini düşük tutmaktadır (Huo, 2002).

Geleneksel bir ilaç olarak, dut yaprağı ateşi tedavi etmek, kan basıncını düşürmek, insülin duyarlılığını arttırmak ve karaciğeri korumak için kullanılmıştır. Günümüzde, dut yaprağı

sadece yararlı bitkisel ilaçlar olarak düşünölmekle kalmayıp, aynı zamanda dut yaprağı çayı ve içeceği üretmek için fonksiyonel gıdalar veya gıdalara besleyici katkı maddeleri olarak değeriendirilmektedir. Dut yaprağının kimyasal bileşenleri ve biyoaktif etkileri üzerine yapılan son araştırmalara göre, antioksidan aktivitenin terapötik etkilerinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Sun vd., 2018).

2.2. Proteinler

Protein kelimesinin Latincedeki karşılığı “yaşayan varlıklar için elzem azotlu öge” dir. Proteinler canlı bir hücrenin kuru ağırlığının ortalama %50’sini oluşturan, kompleks yapıdaki makro moleküllerdir. Hücre yapısında önemli role sahiptir. Proteinler aminoasit birimlerinden oluşan ve molekül ağırlıkları 5.000 ile birkaç milyon dalton değeri arasında olan biyopolimerlerdir. Değişik proteinler, farklı sayı ve çeşitte aminoasit içerirler ve yapıyı oluşturan aminoasitler birbirlerine peptit bağlarıyla bağlandıklarından polipeptit yapısına sahiptirler. Proteinler birtek polipeptitten meydana gelebildikleri gibi birkaç polipeptitin bir araya gelmesiyle de oluşabilirler (Saldamlı, 2007).

Proteinler, 19 farklı a-amino asitten ve bir imino asitten (prolin) oluşan polimerlerdir ve peptit bağları olarak da bilinen amid bağları ile yapıları oluşmuştur. Amino asit bileşimi sadece a-karbon atomundaki yan zincir grubunun kimyasal yapısında farklılık gösterir. Amino asitlerin (dolayısıyla proteinlerin) yük, çözünürlük ve kimyasal reaktivite gibi fizikokimyasal özellikleri yan zincir gruplarının kimyasal yapısına bağlıdır. Alifatik (Ala, Ile, Leu, Met, Pro ve Val) ve Aromatik (Phe, Trp ve Tyr) amino asitlerin yan zincirleri polar değildir ve dolayısıyla suda çözünürlükleri sınırlıdır. Yüklü amino asitler (Arg, Lys, His, Glu ve Asp) ve yüksüz amino asitlerin (Ser, Thr, Asn, Gln ve Cys) yan zincirleri suda oldukça çözünür (Damodaran, 2017).

Proteinlerin besin değeri veya kalitesi; protein çeşidi, amino asit bileşimi, esansiyel amino asit oranları, sindirim sırasında hidrolize duyarlılık, protein kaynağı ve proses etkinliği ile değişmektedir (Friedman, 1996).

Bitkiler kendi proteinlerinin sentezlerini kök ve yapraklardan emilen inorganik kaynaklardan (CO_2 , su ve azot) karşılayabildikleri halde, insanlar vücut proteinlerinin sentezini yapabilmek için azot kaynaklarını diyetdeki bitkisel ve hayvansal proteinlerden sağlamak zorundadır. Bu kaynakların tüketimiyle vücuda alınan proteinler, sindirim sonucu aminoasitlere kadar indirgenmektedir (Saldamlı, 2007).

Bitkisel proteinler birçok değerli biyoaktif bileşen içermesinden dolayı araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Son zamanlarda hayvansal kaynaklı proteinlere alternatif olarak bitkisel kaynaklı proteinlerin gıda endüstrisinde kullanımını oldukça artış göstermiştir.

Ispanak yapraklarının araştırıldığı bir çalışmada yapraklardan elde edilen proteinler farklı enzimlerle hidrolize edildikten sonra hayvanlar üzerinde biyoaktiviteleri incelenmiş ve yaprak proteinlerinin yüksek antihipertansif aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Yang vd., 2004).

Soyadan elde edilen proteinlerin ısı işlem ve fermentasyon gibi proseslerden geçtikten sonra birçok kanser hücresinde sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Kitts ve Weiler, 2003).

Yapılan bir çalışmada patates köklerinden ve patates endüstrisi yan ürünlerinden proteinler saflaştırılarak biyoaktivitenin (ACE inhibitör aktivitesi) değişme durumu incelenmiştir. Özellikle proteinlerin farklı enzimlerle hidrolize edildikten sonra yüksek ACE inhibisyon aktivitesi gösterdiği bulunmuştur (Pihlanto vd., 2008).

2.3. Proteinlerin Ekstraksiyonu

Proteinler genellikle su, gliserol, dietilformamit veya formik asit gibi kuvvetli polar çözücülerde çözünürler. Proteinlerin çözünürlüğü, yapıdaki polar (hidrofilik) ve apolar (hidrofobik) gruplara bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak proteinlerin çözünürlüğü protein-protein ve protein-çözücü interaksiyonları arasındaki dengelerin termodinamik olarak ifade edilmiş halidir.



Proteinler belli bir çözücü içinde yük dengesi veya protein-çözücü etkileşimi sayesinde kararlı bir halde kalabilirler. Bu kararlı durum proteinin yapısında bulunan aminoasitlerin ve çözücü formun özelliklerine göre değişiklik gösterir. Kararlı durumu oluşturan etmenler ortadan kaldırıldığında proteinin çökmesi sağlanmış olur (Saldamlı, 2007).

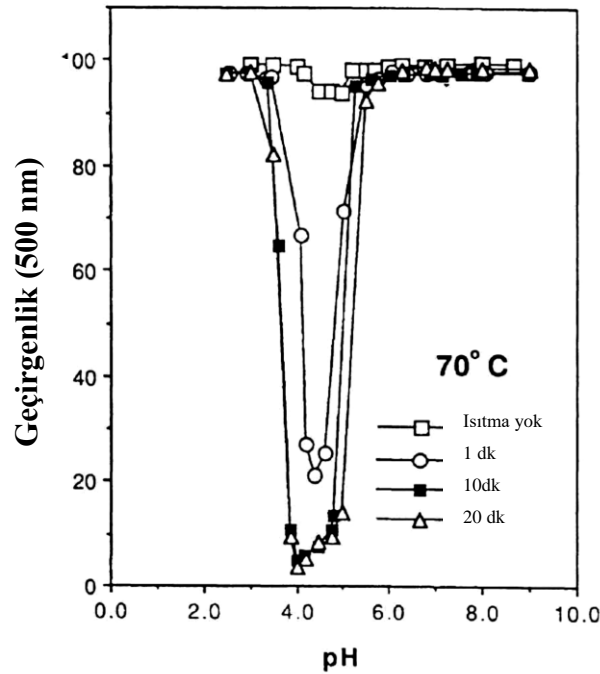
2.3.1. İzoelektrik noktada çöktürme

Sulu çözeltilerde proteinlerin çözünürlüğü pH'ya bağlıdır. İzoelektrik pH'nın altında ve üstündeki değerlerde proteinler net bir yük taşır ve elektrostatik itme ve iyonik hidrasyon, proteinin çözünmesini teşvik eder. Proteinlerin çoğu izoelektrik pH'da (pI) minimum çözünürlük özelliği gösterirler ve bu noktada iyonik hidrasyon ve elektrostatik itme

minimumken; polar olmayan yüzeyler arasında hidrofobik etkileşim maksimumdur (Damodaran, 2017).

Proteinlerin izoelektrik noktasında, protein yüksüz olup elektriksel bir alanda kutuplara hareket edemeyecek bir durumdadırlar. Sütte bulunan kazein gibi bazı proteinlerin, çözelti pH'sının bu proteinin izoelektrik noktasına getirilmesiyle kolay bir şekilde çökme işlemi sağlanır. Bu özellik kullanılarak fermente süt ürünlerinin elde edilmesi sağlanmaktadır (Saldamlı, 2007).

Peynir altı suyu protein izolatlarının (α -lactalbumin, β -lactoglobulin ve bovine serum albumin) ısı etkisiyle konformasyonel değişikliklerinin araştırıldığı bir çalışmada ısı uygulanmayan protein izolatlarının izoelektrik noktada ($pI = 4.8-5.2$) bir miktar çözüldüğü ve sebebinin protein yüzeyinde çok fazla hidrofilik/ hidrofobik grubun varlığından kaynaklandığı belirtilmektedir. Ancak farklı sürelerde uygulanan ısı işlemi (70°C) ardından pH çözünürlük profili (Şekil 2.1) incelendiğinde pH 4,6'da minimum çözünürlük olduğu görülmektedir. Isı uygulaması, proteinlerin yüzeydeki hidrofobik /hidrofilik durumunu etkileyerek protein-protein ve protein-çözücü dengesini değiştirmektedir (Zhu ve Damodaran 1994).



Şekil 2.1: 70°C 'de, farklı sürelerde ısı işlem uygulanan peynir altı suyu proteinlerinin pH-çözünürlük profili.

2.3.2. Nötral tuzlarla çöktürme

Proteinlerin sulu çözeltilerine amonyum sülfat, sodyum sülfat veya alkali fosfat gibi nötral yapıda tuzların muamelesi sonucu proteinler çökme eğilimi gösterirler. Yüksek tuz konsantrasyonu protein yapının yüzeyindeki su moleküllerine etki ederek elektrostatik gücü değiştirir ve bu durum proteinlerin çökmesine sebep olur.

Ayrıca Hg^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+} , Au^{+} ve Pb^{+4} gibi ağır metal iyonları ve bunların tuzları; hidroklorik, sülfirik, nitrik ve asetik asit gibi asitlerin sulu çözeltileri; sulu protein çözeltilerine etil alkol ve aseton gibi organik çözücülerin eklenmesi veya polietilenaminler ve polietilenglikoller gibi polimerlerden de yararlanılarak proteinlerin çökmesi sağlanabilir (Saldamlı, 2007).

2.4. Proteinlerin Hidrolizi Ve Biyoaktif Peptitlerin Oluşumu

Proteinler asit, alkali veya enzimlerle hidrolize edildiğinde L-konfigürasyon yapısındaki a-aminoasitlere kadar parçalanırlar. Protein hidrolizatlarının yapısındaki aminoasitlerin sayısı genelde 20 kadardır (Saldamlı, 2007).

Proteinlerin hidrolizi, fonksiyonel, immünolojik ve biyoaktif özellikleri geliştirir ve hidrolizatları doğal proteinlerden üstün kılar. Biyopeptitler vücudumuzda endojen sinyaller veya hormonlar gibi hareket ederek onlarla benzer reseptör ve enzimlerle etkileşime girerler (Arrutia vd., 2016).

Biyoaktif peptitler proteinlerin izoelektrik noktada çöktürülmesinden sonra proteinlerin sınırlı hidrolizi sonucu açığa çıkmaktadır. Biyoaktif peptitler, vücut fonksiyonları üzerinde olumlu bir etkiye sahip olan ve davranışsal, nörolojik, hormonal, gastrointestinal ve beslenme gibi birçok biyolojik süreci etkileyebilecek spesifik protein parçalarıdır. Biyoaktif peptitler her molekülünde genellikle 2 ila 20 aminoasit kalıntısı bulunduran kısa peptitlerdir (Pritchard vd., 2010).

Protein ve peptitlerin emilmeden önce gastrointestinal sistemde parçalanmaları ve modifiye olmaları biyoaktivitenin sağlanması açısından önem teşkil etmektedir (Sun vd., 2018).

Bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteinlerin içinde inaktif olan ancak sindirim sırasında enzimatik hidrolizle veya fermentasyon ve ısı işlem gibi proseslerle aktifleşen, fizyolojik

olarak pek çok faydası bulunan biyoaktif peptitler oluşur (Korhonen, 2009; Kınık ve Gürsoy, 2002).

Farklı gıda kaynaklarından biyoaktif peptit oluşumu in vivo (canlı içinde) ve in vitro (canlı dışında) olmak üzere ikiye ayrılır. İn vivo oluşum gastrointestinal sistemde meydana gelirken in vitro oluşum, enzimatik hidroliz ve fermentasyon gibi alt sınıflara ayrılır (Chalamaiah vd., 2019; Fujita vd., 2000).

Dut ve dut yapraklarında antihipertansif kapasiteyi belirlemeye yönelik İn-vivo şartlarda yapılan çalışmalara bakılacak olursa;

Suyla ekstrakte edilen dut örnekleri (*Cudrania tricuspidata*-720 mg/kg) hipertansiyonlu ratlara 2 hafta boyunca verilmiş ve sonuç olarak kan basıncı seviyesinde istatistiksel düzeyde düşüş olduğu bulunmuştur (17 mmHg) (Kang vd., 2002).

Hipertansiyonlu ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada ratlara 42 gün boyunca farklı oranlarda dut örnekleri (*Morus bombycis* KOIDZUMI (MK)) verilmiş ve 100mg/kg MK verilen dozun kan basıncı seviyesini önemli oranda düşürdüğü bulunmuştur (20mmHg) (Oh vd., 2007).

Bir çalışmada ethanolle ekstrakte edilmiş dut yapraklarının (*Morus alba L.*) vasodilatör etkisi, ratlarda nitrik oksit (NO) serum seviyesine ve tavşanlarda damar çapı genişlemesine bakılarak incelenmiştir. Sonuç olarak en yüksek NO serum seviyesi 400 mg/kg bw dut yaprağı konsantrasyonunda bulunmuştur ($4.62 \pm 3.05 \mu\text{M}$). Ayrıca tavşanlarda 202.67 mg/kg bw konsantrasyonunda dut yaprağı ekstraktının kullanılmasından 60 dk sonra en yüksek vasodilatör etkinin olduğu bulunmuştur (Kurniati vd., 2014).

İN-vivo şartlarda hipertansiyonlu farelere oral yolla farklı dozlarda *Morus alba* ekstraktı (MAE) verilmiş ve 400 mg/kg MAE verilen farelerdeki kan basıncı seviyesinin diğer dozlarda verilenlere göre daha düşük olduğu bulunmuştur (Carrizzo vd., 2016).

2.4.1. Gastrointestinal sistem

Proteinlerin gastrointestinal sindirimi genel olarak mideye alım (yeme), sindirim ve emilim şeklinde 3 aşamada meydana gelmektedir. Proteinler ilk aşamada gastrointestinal sistemde bulunan pepsin, tripsin, kimotripsin ve peptitaz gibi farklı proteolitik enzimlerle hidrolize uğrayarak farklı zincir uzunluğunda peptitleri meydana getirirler. Oluşan peptitlerin bir kısmı gastrointestinal sistemde aktivitelerini gösterirken diğerleri ise hedef organ ve dokulara ulaşarak absorbe edilirler.

2.4.2. Enzimatik hidroliz

Şimdiye kadar biyoaktif peptitlerin üretimi için en bilinen yol farklı endüstriyel büyüklükte tekniklerin kullanımıyla yapılan enzimatik parçalanmadır. Proteolitik enzimlerin özgünlüğü ve proses koşulları; hidrolizatların peptit bileşimini ve böylece ACE inhibitör aktivitesini etkilemektedir. Pepsin-pankreatin veya pepsin-kimotripsin-tripsin kombinasyonu genellikle insanlarda gıda proteinlerinin gastrointestinal bozulmasını simüle etmek için kullanılır. Doğru enzime karar vermek kadar çalışılan enzimin hidroliz derecesini etkileyen pH, sıcaklık, enzim/substrat oranı ve hidroliz zamanı gibi parametreler de vardır (Guang ve Phillips, 2009).

Gıda proteinlerinin in vitro enzimatik hidrolizi rutin olarak pepsin, tripsin, papain, alcalase, pankreatin, kimotripsin, termolizin, flavourzyme, nötraz ve protamex gibi proteolitik enzimler kullanılarak gerçekleştirilir (Chalamaiah vd., 2019).

Pankreatik enzimler, bilinen birçok biyoaktif peptitin kimyasal karakterizasyonu ve tanımlanması için kullanılmaktadır. Pankreatik enzimler, özellikle tripsin, bilinen birçok biyoaktif peptitin kimyasal karakterizasyonu ve tanımlanması için kullanılmaktadır. Örneğin ACE-inhibitörü peptitler yaygın olarak tripsin kullanılarak üretilmektedir. Bununla beraber bazı alkalaz, kimotripsin, pankreatin, pepsin gibi enzimler ile bakteriyel ve fungal kaynaklı enzimlerin de içinde bulunduğu proteinazların farklı kombinasyonları kullanılarak biyoaktif peptitler üretilebilmektedir (Korhonen, 2009; Pihlanto-Leppälä, 2001).

Proteinlerin hidrolizinden sonra, hidrolizatlardaki farklı büyüklükteki peptitleri fraksiyonalize etmek amacıyla çeşitli yöntemlerden faydalanılmaktadır. Ultrafiltrasyon membranları (membran filtrasyon teknikleri) spesifik peptit fraksiyonlarının zenginleştirilmesinde başarıyla kullanılmaktadır (Pihlanto-Leppälä, 2001).

Yapılan bir çalışmada mısır gluteni kullanılarak Flavourzyme enzimi ile örneklerin hidrolizi gerçekleştirilmiş ve ardından ultrafiltrasyon membranlarıyla peptitlerin fraksiyonlara ayrılması sağlanmıştır. Sonuç olarak peptitlerin fraksiyonlarına ayrılmasının biyoaktif peptitlerin eldesinde verim artışına neden olduğu belirtilmiştir (Kim vd., 2004).

Bugüne kadar peptitlerin ACE inhibisyon aktivitesiyle olan korelasyonunu içeren bilgiler sınırlıydı. Son yapılan araştırmalar; ACE inhibitörü peptitlerin üretilmesi ve tanımlanmasıyla beraber peptit dizilimi ve büyüklüğüyle biyoaktivite arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. İn vivo şartlarda kısa zincirli peptit dizilimlerinin ACE inhibisyon

aktivitesinin daha yüksek olduğu ve bunun sebebinin kısa zincirlerin emiliminin daha yüksek olabileceği vurgulanmaktadır. Fakat mide-bağırsak sisteminde kısmi olarak parçalanabilen daha uzun peptitlerin de ACE inhibe edici bir etkiye sahip olduğuna dair yapılan çalışmalar mevcuttur (Martin ve Deussen, 2017).

Membran filtrasyon tekniğiyle biyoaktif peptitlerin aktivitesinin araştırıldığı birçok çalışmada 10 ila 50 kDa arasında kesilmiş membranlar kullanıldığı ve bu aralıkta peptit konsantrasyonlarının oldukça yüksek ACE inhibisyonu verdiği bulunmuştur. Ayrıca 1 kDa membranı ile bazı aktif peptitlerin kaybolabileceği belirtilmiştir (López-Fandiño vd., 2006).

2.4.3. Fermentasyon

Çeşitli gıda proteinlerinden biyoaktif peptitleri elde etmek için, fermentasyon, genel olarak güvenli kabul edilen (GRAS) farklı mikrobiyal suşlar, örneğin laktik asit bakterileri (LAB) kullanılarak gerçekleştirilir (Chalamaiah vd., 2019).

Sütün laktik asit bakterileriyle (LAB) fermentasyonu sırasında ACE inhibitörü, immüno modulator, opioid ve antioksidatif gibi biyolojik aktiviteye sahip çok sayıda bileşen meydana gelir (Farvin vd., 2010).

Süt ürünlerinin fermentasyonu sırasında, LAB sütün başlıca proteini olan kazeini hidrolize ederek gelişimleri için gerekli peptitlere ve aminoasitlere ayırırlar. Dolayısıyla biyoaktif peptitler fermente süt ürünlerinin üretiminde bakteriler tarafından oluşturulurlar (Paul, Somkuti, 2009).

Laktik asit bakterileri süt proteinlerini peptitlere parçaladığında bakteriyal proteinazlar tarafından bu inhibitörler oluşturulur ve bakterilerin büyümesi için gerekli nitrojen kaynakları olarak kullanılırlar. Proteolitik aktivite, peptitlerden inhibitör üretiminde önemli bir rol oynar. Laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemleri oldukça spesifik değildir, bu nedenle kazein çeşitli yerlerinden bölünür. Son zamanlarda araştırmacılar ACE inhibitörü peptitlerin fermentasyon esnasında *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* ve *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* gibi farklı suşlar tarafından salındığını belirtmişlerdir (Pihlanto vd., 2010).

Çin kültüründe geleneksel bir yiyecek olarak kullanılan Douchi' nin üretiminde soyanın fermentasyonundan yararlanılmaktadır. Yapılan bir çalışma ile bu ürünün fermentasyonu sırasında biyoaktivitenin (ACE inhibitör aktivitesi) değişimi incelenmiş ve iki haftalık fermentasyon prosesi boyunca aktivitenin istatistiksel olarak arttığı ancak fermentasyon

süresinin uzamasına bağlı olarak aktivitenin düşmeye başladığı görülmüştür (Wang vd., 2013).

2.5. Biyoaktif Peptitler Üzerine Isıl İşlemin Etkisi

Isıl işlem, hasat sonrası hastalıkları kontrol etmek, çürümeyi kontrol etmek, meyve kalitesini korumak, hücre duvarlarını korumak ve aşırı olgunlaşmayı önlemek için birçok meyvede kullanılmaktadır (Zhou vd., 2015).

Proteini saflaştırılacak gıda kaynağına ısıl işlem gibi uygulamalar yapılarak ekstraksiyon verimi arttırılabilmektedir. Isıl işlemin yoğunluğuna bağlı olarak proteinlerde yapısal modifikasyonlar meydana gelerek hem teknolojik açıdan önemli olan fonksiyonel özelliklerde hem de proteinlerin biyolojik değerini belirleyen besin özelliklerinde pozitif yönde değişimler ortaya çıkabilmektedir (Otağ ve Hayta; 2013).

Genel olarak süt proteinlerinin ısıl işlem ile muamele edilmesi aminoasitlerin çapraz bağlanmasını sağlar. Bu durum proteolize duyarlılığı etkileyebilir ve bu proteinlerden kaynaklanan biyoaktif ACE inhibitörü ve antihipertansif peptitlerin verimini değiştirebilir. Peptitlerdeki biyoaktif alanların yapı değişikliği, aktivitenin doğrudan etkilenmesine sebep olabilir (López-Fandiño, 2006).

Depolama ve gıda işleme esnasındaki stabilite, kurutma, ısıtma ve fermentasyon gibi gıdaya uygulanan işlemler bu peptitlerin biyoaktivitesini etkileyebilmektedir (Schanbacher vd., 1997).

Gıda işleme yöntemlerinden ısıtma ve yüksek basınç uygulamaları, proteinlerin sindirilebilirliğini arttırarak peptitlerin serbest hale geçmesini sağlar. Bu tip uygulamalar proteolizi teşvik ederek biyoaktif peptitlerin oluşumunu hızlandırmaktadır (Fitzgerald, 2006).

Biyoaktif peptit üretimini sağlamak üzere farklı gıdalara veya gıda bileşenlerine ısıl işlem uygulamasının, salınan peptitlerin sayısını ve miktarını arttırdığı bildirilmiştir (Arrutia vd., 2016).

Yapılan bir çalışmada peynir altı suyu protein hidrolizatlarına ısıl işlem uygulamasının biyoaktivite üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 65 °C'de ısıl işlem görmüş izolatların ACE inhibitörü aktivitesinin 95 °C'de ısıtmaya göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Da Costa vd., 2007).

Biyoaktif peptit üretiminde örneklere ısı işlem uygulamasının biyoaktivite üzerinde etkisinin olduğu ancak yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça aktivitenin azaldığı bilinmektedir.

Aktivitedeki bu farklılığın sebebi protein izolatlarındaki yapısal değişikliklerin indüklenmesiyle açıklanmaktadır. Düşük sıcaklıklarda protein yapısında bulunan hidrofobik kümelerin varlığıyla karakterize edilen yapılardaki katlanmalar açılır ve proteinlerin hidrolizi sırasında enzimlerin bu bölgelere ulaşarak aktivite göstermesine olanak tanır. Ancak 90 °C ve daha üzerindeki sıcaklıklarda yüksek molekül ağırlıklı, çözünmez yapılar oluşur ve bu durum biyoaktivitede kayıplara sebep olur (Hirose, 1993 ; La Fuente vd., 2002).

2.6. Biyoaktif Peptitlerin Türleri

Biyoaktif peptitlerin biyolojik aktivitesi antimikrobiyal etki, kan basıncını düşürücü etki (Anjiotensin-I Converting Enzyme (ACE) inhibitörü), kolesterol düşürücü etki, antitrombotik ve antioksidan etki, mineral absorpsiyonu/biyoyararlılığını artırma, immunomodülatör ve opioid etkiler olarak sıralanabilir (Moslehisad vd., 2013).

Biyoaktif peptitlerin bahsedilen biyolojik aktiviteleri, insan vücudunda gastrointestinal sindirim sırasında veya gıdaların işleme prosesleri sonucunda meydana gelirler (Schanbacher vd., 1997).

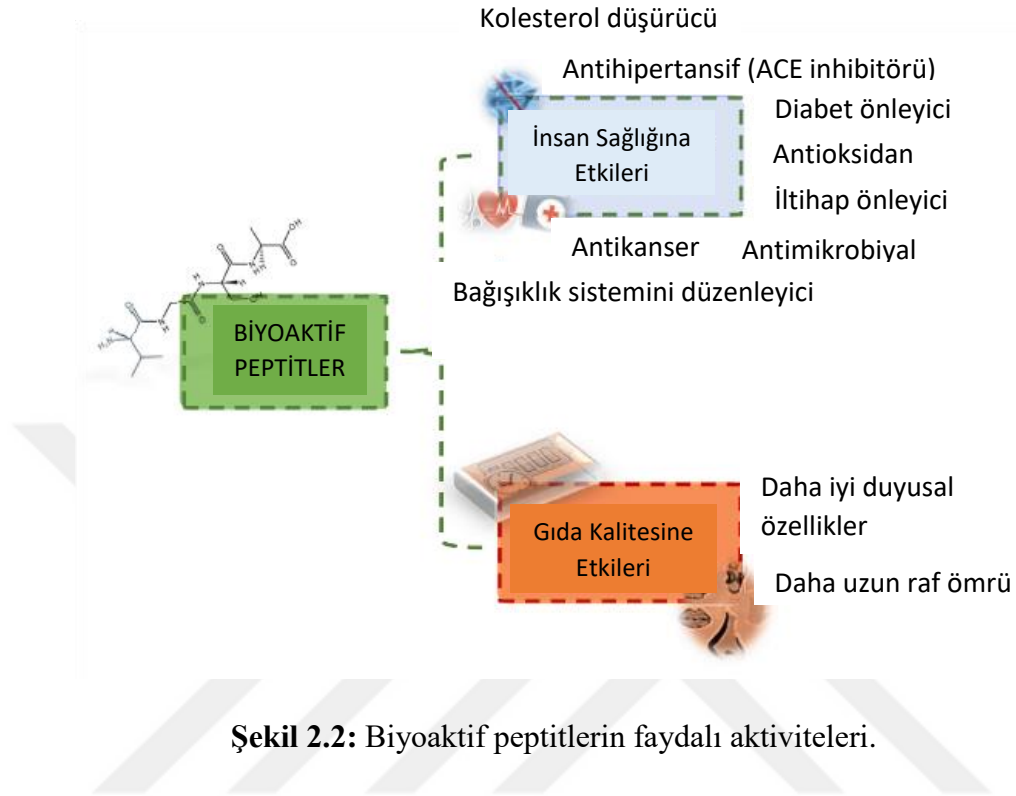
Bir protein veya peptit, beslenme etkilerinin ötesinde vücudun bir veya daha fazla fonksiyonu üzerindeki yararlı etkisini başarılı bir şekilde gösteriyorsa fonksiyonel bir bileşen olarak adlandırılır, böylece bu peptitlerin biyolojik etkileri genel olarak sağlık için önemlidir veya bir hastalığa yakalanma riskini azaltmaya olanak tanır (Garcia vd., 2013).

Biyoaktif peptitlerin kimyasal yapısı ve biyolojik aktivitesi arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte aktivitenin aminoasitlerin dizini, N ve C-terminal aminoasidinin türü, peptit zincirinin uzunluğu, peptiti oluşturan aminoasitlerin yük ve polaritesi gibi özelliklerine bağlı olduğu belirtilmektedir (Li ve Yu, 2015).

Son yıllarda dünya üzerinde gıda kaynaklı proteinlerden meydana gelen biyoaktif peptitlerin insan sağlığına faydalı etkileri ile ilgili geniş çaplı birçok çalışma yürütülmüştür (Pan vd., 2005).

Biyolojik aktivite taşıyan proteinler organizmada yer alan proseslerde aktif işlevler üstlenmektedir (Saldamlı, 2007).

Biyoaktif peptitlerin faydalı aktiviteleri özet şeklinde Şekil 2.2 'de belirtilmiştir (Lorenzo vd., 2018).



Şekil 2.2: Biyoaktif peptitlerin faydalı aktiviteleri.

2.6.1. ACE inhibitörü peptitler

ACE inhibitörleri ilk olarak yılan zehrinden elde edilmişlerdir. Ardından çeşitli ACE-inhibitörleri kazein, jelatin ve mısır gibi gıdaların proteinlerinin spesifik peptitlerinde belirlenmişlerdir (Pihlanto-Leppälä, 2001).

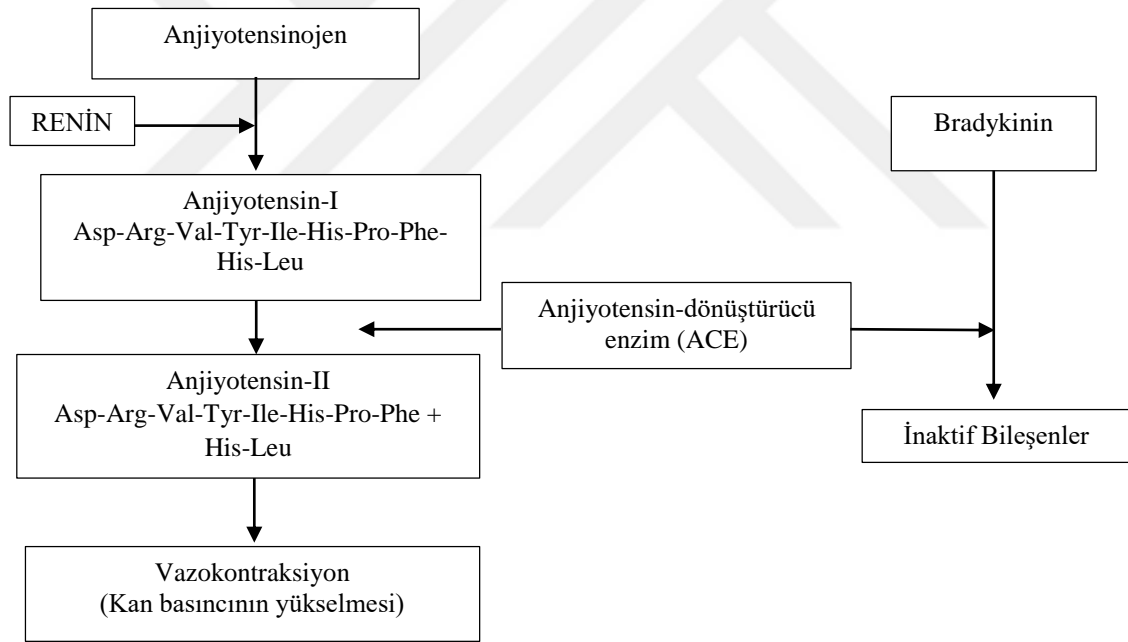
ACE inhibitör peptitler çeşitli süt, yumurta, kas proteinleri, soya fasulyesi, maş fasulyesi, ayçiçeği, pirinç, mısır, buğday, brokoli, mantar, sarımsak, ıspanak ve şarap gibi çok değişik örnekler üzerinde araştırılmıştır (Guang ve Phillips, 2009).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) bir dipeptil karboksipeptitazdır ve renin-anjiyotensin sisteminde (RAS) yer alır. Plazma, akciğer, böbrek, kalp, iskelet kası, pankreas, beyin gibi dokularda bulunan ACE, birçok fonksiyona sahiptir ve çeşitli peptit substratlarının C-terminal uçlarından dipeptitleri açığa çıkarmaktadır (Saleh vd., 2016).

Vücutta kan basıncının kontrol edilmesini sağlayan biyokimyasal birçok mekanizma vardır. En çok bilinen kan basıncı düzenleyicilerden ilki renin-anjiyotensin sistemi (RAS) ile ilişkilendirilmektedir (Saleh vd., 2016).

İlk sistemde; anjiyotensinojenin renin ile hidrolizi sonucu inaktif bir peptit olan Anjiyotensin I oluşur ve Anjiyotensin dönüştürücü enzimin (ACE), Anjiyotensin I ' in karboksil ucundaki iki amino asidi ayırması ile Anjiyotensin II meydana gelir. Bir oktapeptit olan Anjiyotensin II potansiyel bir damar daraltıcıdır (vazokonstriktör) (Saleh vd., 2016; Pihlanto vd., 2010).

İkinci sistem olarak ise ACE, damar genişletici (vasodilative) aktivite gösteren bradykinin enzimini parçalamaktadır ve adrenal kortekste aldosteronun açığa çıkmasını da stimüle etmektedir. ACE inhibitörü peptitler ise ACE'yi inhibe ederek kan basıncını düzenlemektedir (Patten vd., 2016; Akpınar ve Uysal, 2013).



Şekil 2.3: Vücutta kan basıncının kontrol edilmesini sağlayan mekanizmalar.

ACE'nin inhibe edilmesi antihipertansif etkiye neden olmaktadır. ACE birçok doku ve biyolojik sıvılarda oluşur ve kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir fizyolojik rol oynar. Hipertansiyon; koroner kalp hastalıkları, felç ve böbrek hastalıklarının en önemli risk faktörüdür. Gıdalarda doğal olarak bulunan biyoaktif bileşenler hipertansiyonun önlenmesinde etkilidirler (Patten vd., 2016).

Birçok bitkisel ve hayvansal kaynaklı protein hidrolizatlarında ACE inhibisyon etkisi üzerine çalışmalar yapılmıştır (Tavares vd., 2011). Bitkisel kaynaklardan elde edilen potansiyel ACE inhibitörü peptitlerin elde edildiği kaynaklar, hidrolizasyonda kullanılan enzimler ve IC_{50} değerleri Çizelge 2.2' de belirtilmiştir (Guang ve Phillips 2009).

Çizelge 2.2: Bitkisel kaynaklardan elde edilen ACE inhibitörü peptitlerin elde edildiği kaynaklar, hidrolizasyonda kullanılan enzimler ve IC_{50} değerleri.

Kaynak	Sorumlu Protein	Enzim	IC_{50} (μ M)
Soya	Bütün protein	Alkalaz	12.3
Maş fasulyesi	Protein izolatu	Alkalaz	26.5
Ay çiçeği	Protein izolatu	Pepsin-pankreatin	6.9 ^a
Pirinç	Protein izolatu	Alkalaz	18.2
Mısır	Gluten	Alkalaz	14.2
Brokoli	Su ile ekstraksiyon	Enzim yok	10.5 ^b
Buğday	Gliadin	Pepsin-proteaz M	2.7
Kara buğday	Bütün protein	Pepsin-kimotripsin	13
Ispanak	Rubisko	Pepsin-pankreatin	0.6

^aAynı deney şartlarında captoprilin IC_{50} değeri 0.041 μ M olarak bulunmuştur. ^b IC_{50} değeri μ g/mL olarak açıklanmıştır.

Dut (*Morus spp.*) yaprağı ekstraktlarının biyoaktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada ekstraktların damar genişletici (vasodilatör) etkisinin yüksek olduğu bulunmuştur. Anjiotensin I-indüklenme konsantrasyonunun (IC_{50}) 25 μ g/mL olduğu ve bu değerin captopril ile benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (Pothinuch vd., 2017).

Gammaaminobütirik asit (GABA) içeren suyla ekstrakte edilmiş dut yapraklarıyla yapılan bir çalışmada ratlar üzerinde anitihipertansif etki araştırılmış ve ACE-inhibisyon aktivitesi (IC_{50}) 29.8 mg/mL değeriinde bulunmuştur (Yang vd., 2012).

Hipertansiyonun önlenmesinde kişisel beslenme alışkanlıkları oldukça önemli bir yere sahiptir ve bu yüzden antihipertansif etkiye sahip yeni gıdaların ve gıda bileşenlerinin keşfedilmesi gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Pihlanto vd., 2010).

Kan basıncına ilaveten, ACE inhibisyonu, organizmanın savunma ve sinir sistemi aktivitesini de içeren farklı kontrol sistemlerini de etkileyebilmektedir (Tavares, 2011).

ACE inhibisyon aktivitesi birçok analiz metoduyla test edilebilmektedir; spektrofotometrik, florimetrik, radyokimyasal, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforez yöntemleri en yaygın kullanılan yöntemlerdendir (Saleh vd., 2016).

Sentetik antihipertansif ilaçlar (captopril,enalapril) ACE inhibisyon potansiyeline sahiptir ve hipertansiyonlu kişilerin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır, ancak bu ilaçların çok ciddi yan etkileri bulunmaktadır (uykusuzluk, anjiödem, öksürük, alerjik reaksiyonlar, ateş ve baş ağrısı). Bu nedenle de, bitkisel bileşiklerin ve ekstraktların biyoaktivitesinin belirlenmesine ihtiyaç vardır ve doğal ACE-inhibitörü peptitler kan basıncını düzenlemede bu ilaçlara alternatif olarak düşünülmektedir (Mirzapour vd., 2017).

İnsan beslenmesinde fizyolojik öneme sahip peptitleri içeren proteinler, bazı fonksiyonel gıdalar ile nutrasötik ve farmasötik ilaçların hazırlık aşamasında aktif bileşen olarak kullanılmaktadır(Akpınar ve Uysal, 2013).

Yapılan araştırmalara göre gelişmiş ülkelerde yaşayan popülasyonun yaklaşık %80'i bitki kaynaklı ilaçlara güvenmektedir. 2015'te Business Communications Company Research (BCC) tarafından yapılan araştırmaya göre botanik ve bitki kaynaklı ilaç pazarı 25.6 milyar dolar olduğu ve bu piyasanın 2020'de yaklaşık 35 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Zhang vd., 2018; Gryn-Rynko vd., 2016).

Böbrek problemlili olanlar veya hamile kadınların farmakolojik ACE inhibitör ilaçların yan etkilerinden etkilenmemeleri için doğal inhibitörlere yönelmeleri tavsiye edilmektedir (Majumder ve Wu, 2010).

2.6.2. Antioksidatif peptitler

Serbest radikal reaksiyonlarının ürünleri olan reaktif oksijen türleri (ROS) gıdalarda negatif değişikliklere sebep olduğu gibi insanlarda da hastalık etmeni olarak görülmektedir (Sun vd., 2018).

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu önleyerek veya radikaller, hidrojen peroksit ve diğer peroksit gibi türleri temizleyerek işlev görebilen bileşenler olarak tanımlanmaktadır (Pihlanto, 2006).

Son zamanlarda, gıda kaynaklı antioksidan peptitlere olan ilgi ve bu peptitlerin oksidatif stresi önlediğine dair kanıtlar artmıştır (Moslehisad vd., 2013). Biyoaktif peptitler gibi doğal antioksidanların sentetik antioksidanlara göre daha güvenli ve daha sağlıklı alternatifler olduğu düşünülmektedir (Mirzapour vd., 2016).

Enzimatik (lipoksigenaz) ve enzimatik olmayan peroksidasyon tepkimelerini önleyen antioksidan özellikteki biyoaktif peptitler gıda kaynaklı proteinlerin içinde doğal olarak

bulunmaktadır. Özellikle peptitlerin N-terminal uçlarında bulunan lösin ve prolin kalıntılarının antioksidan kapasitelerinin yüksek olduğu belirtilmektedir. Biyoaktif peptitlerin BHT ve BHA (butil hidroksi anisol ve toluen) gibi peptit formda olmayan antioksidanlarla sinerjik etkiyi kolaylaştırmaktadır (Kitts ve Weiler, 2003).

Hidrolizatların antioksidan aktivitesi, proteaz özgüllüğüne bağlı olarak türetilen peptitlerin karakteristik amino asit dizilimlerine özgü görünmektedir (Pihlanto, 2006). Peptitlerin antioksidan aktivitesi serbest radikaller için bağlayıcı etki göstermelerine ve metal iyonları ile şelat oluşturmalarına bağlanmaktadır. Biyoaktif peptitlerin antioksidan aktivitelerinin sülfidril gruplarından, hidrofobik aminoasitlerden, bazı aromatik aminoasitler ve histidinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Simsek ve Kılıç, 2016; Park vd., 2010).

Antioksidan peptitler, antioksidan olmayan öncül proteinlerden farklı olarak proteolitik mikroorganizmaların veya izole enzimlerin aktivitesi kaynaklı ekstrakte edilirler. Proteinlerden antioksidan biyoaktif peptitler elde etmek için fermentasyon süreçlerinin ve enzimlerin kullanımı, en sık kullanılan yöntem olan izole enzimler nedeniyle kurulmuştur.

Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen potansiyel antioksidan aktivite gösteren peptitlere ait hidrolizasyonda kullanılan enzimler, mikroorganizmalar ve analiz metodları Çizelge 2.3 'de belirtilmiştir (Lorenzo vd., 2018).

Çizelge 2.3: Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen antioksidatif peptitlere ait hidrolizasyonda kullanılan enzimler, mikroorganizmalar ve analiz metodları.

Gıda	Enzim/ Mikroorganizma	Açıklama
Süt	<i>L.rhamnosus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. casei</i>	ABTS, <i>L. casei</i> kaynaklı peptitler en yüksek antioksidan aktivite göstermiştir
Domates tohumu	<i>B. subtilis</i>	DPPH, antioksidan aktivite konsantrasyona bağlı
İstiridye	Pepsin, tripsin, kimotripsin	Radikal süpürme aktivitesi, DNA’da bulunan oksidatif hasar önlenmiştir.
Yağsız badem unu	Alkalaz, kimotripsin, flavurzim, pepsin, tripsin	ABTS, alkalaz hidrolizatı en yüksek antioksidan aktivite göstermiştir
Pirinç	Alkalaz	<i>In vivo</i> , kanda malondialdehit seviyesini azalmıştır
Susam	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	<i>In vivo</i> , kanda ve karaciğerde malondialdehit seviyesi azalmıştır
Yer fıstığı unu	Alkalaz, pepsin, tripsin	ABTS, Alkalaz hidrolizatı en yüksek antioksidan aktivite göstermiştir
Keçi sütü proteini	Pepsin	DPPH, peynir altı suyu proteinleri en yüksek antioksidan aktivite göstermiştir

Dut yaprağı proteinleri ve hidrolizatlarına gastro-intestinal sindirim simülasyonu uygulamasının antioksidan kapasiteye etkisinin araştırıldığı bir çalışmada dut yaprağı proteinlerin farklı enzimlerle hidrolizasyonu sağlandıktan sonra yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur (Sun vd., 2018).

Yapılan bir çalışmada dut yapraklarından izole edilen proteinlerin antioksidan aktivitesi (ABTS ve DPPH radikal süpürme aktiviteleri) incelenmiş ve sonuç olarak düşük molekül ağırlığına sahip peptitlerin yüksek antioksidan aktivite gösterdikleri bulunmuştur (Jha vd., 2014).

2.6.3. Diğer biyoaktif peptitler

Biyolojik aktivite gösteren spesifik peptit zincirleri iki veya daha fazla biyolojik aktivite gösterebilirler. Bu durum peptit zincirinde bulunan aminoasitlerin kompozisyonuna, dizilişine ve peptitlerin C-terminal veya N-terminal pozisyonunda bulunan aminoasitlerinin türüne göre değişiklik gösterir (Hernández-Ledesma vd., 2007).

Hayvan ve bitki kökenli birçok gıdadan biyolojik aktiviteye sahip peptitler izole edilmiştir. Bazı biyoaktif peptitler, elde edildikleri gıda kaynakları ve fizyolojik olarak etki ettikleri fonksiyonlar Çizelge 2.4’de belirtilmiştir (Hartmann ve Meisel, 2007).

Çizelge 2.4: Bazı biyoaktif peptitler, elde edildikleri gıda kaynakları ve fizyolojik olarak etki ettikleri fonksiyonlar.

Fizyolojik Etki	Gıda Kaynağı	İlgili Protein
ACE İnhibisyonu/ Antihipertansif	Soya	Soya proteini
	Balık	Balık kas proteini
	Et	Kas proteini
	Süt	a-LA, β -LG a-, β -, κ -CN
	Yumurta	Ovotransferrin
	Buğday	Lizozim
İmmünomodülatör	Brokoli	Gliadin
	Pirinç	Bitkisel protein
	Yumurta	Albumin
	Süt	Ovalbumin a-, β -, κ -CN, a-LA
Opiooid Etki	Buğday	Gluten
	Süt	Gluten a-LA, β -LG a-, β -CN
	Yumurta	Ovotransferrin
Antimikrobiyal	Süt	Lizozim Laktoferrin a-, β -, κ -CN
	Süt	a-, β -CN
Mineral Bağlayıcı	Süt	a-, β -CN
Hipokolestrolemik	Soya	Glisin
	Süt	β -LG
Antioksidan	Balık	Sardalya eti
	Buğday	Buğday germ proteini
	Süt	a-LA, β -LG

Antimikrobiyal peptitler: Bakteri, küf ve virüslere karşı antimikrobiyal aktivite gösteren biyoaktif peptitler çeşitli kaynaklardan elde edilirler. Antimikrobiyal peptitlerin aktivitesi; peptit büyüklüğü, aminoasit bileşimi, hidrofobik yapılar ve ikincil yapı gibi özelliklere bağlı olduğu kadar mikroorganizmaların türüne göre de değiştiği bildirilmiştir. Fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal peptitlerin gıda katkısı olarak kullanılma potansiyeli yüksektir (Kannan vd., 2012). Biyoaktif peptitlerin antimikrobiyal aktivitelerinin kısa zincirli ve katyonik peptitlerden kaynaklandığı bildirilmektedir (Hancock ve Sahl, 2006).

Kolesterol düşürücü peptitler: Hipolipidemik peptitler safra asitlerini bağlayarak kolesterol misellerini bozarlar ve safra asitlerinin absorpsiyonlarını inhibe ederek etki gösterirler (Mazorra-Manzano vd., 2017). Hipokolesterolemik peptitler kolon adenokarsinoma hücreleri tarafından kolesterol emilimini durdurarak etki ettiği bildirilmiştir (Nagaoka vd., 2001).

Opioid peptitler: Opioid peptitler rahatlatıcı etki sağlayan peptitlerdir. Endojen opioid peptitlerle (endorfinler ve enkefalinler) olan yapısal benzerliklerinden dolayı 'ekzorfinler' olarak isimlendirilmişlerdir. Ekzorfinler δ -, μ - ya da κ - tipi opioid reseptörlerle etkileşime girerek aktivitelerini gösterirler. Endojen ve ekzojen opioid peptitler arasındaki ortak yapısal özellikler amino ucundaki tirozinin varlığı ve üçüncü ile dördüncü pozisyonundaki fenilalanin ve tirozin kalıntılarıdır. Süt proteinlerinden elde edilen kazomorfinler ve ekzomorfinler opioid etki gösterirler. (Garcia vd., 2013).

Antikanserojen Peptitler: Biyoaktif peptitlerin pek çok kanser hücresi üzerinde sitotoksik etki gösterme potansiyeli olduğu, yani kanser hücrelerine toksik şekilde etki edip hücreyi öldürme ya da fonksiyonunu durdurma etkisinin olduğu belirtilmiştir (Su vd., 2014).

Bağışıklık sistemini düzenleyici peptitler: İmmünomodülatör peptitler, lenfosit proliferasyonu, antikor sentezi ve sitokin regülasyonu olarak ölçülen bağışıklıktan sorumlu hücre fonksiyonlarını artırabilir. İmmünomodülatör peptitler alerjiye yatkın insanlarda alerjik reaksiyonları azaltabilir ve gastrointestinal sistemde mukozal bağışıklığı artırabilir (Hartmann ve Meisel, 2007).

Mineral bağlayıcı peptitler: Süt kazeinleri, kalsiyum ve fosfat iyonlarını stabilize eder. Kazein proteinlerinin triptik sindirimi, fosforile seril kalıntıları içeren N-terminal uçlarından fosfoseril kümeleri içeren kazeinofosfopeptitleri oluşturur. Bu fosfoseril kümelerinin, kazein misellerinin oluşumuna yol açan kazeinler ve kalsiyum fosfat arasındaki etkileşimden sorumlu olduğu varsayılmıştır. Kazeinofosfopeptitler, kazeinin kalsiyum ve fosfat iyonlarını kompleksleri oluşumunu stabilize etme yeteneğini korur ve böylece genel biyoyararlanımlarını artırır (Hartmann ve Meisel, 2007).

Antidiyabetik peptitler: Diyabet, pankreastan salınan insülin üretimindeki yetersizliği veya yeterince etki etmemesi nedeniyle ortaya çıkan ve dünya genelinde yaygın görülen bir hastalıktır. İnsülinin yetersiz olduğu durum, kan şekerinin artmasına neden olarak kan damarlarına ve dolayısıyla vücut dokusuna zarar verir. Bu durumu önlemek için kan şekeri

seviyesini dzenleyen kilit enzimleri inhibe edebilme özelliğine sahip biyoaktif peptitler kullanılması önerilmektedir (Mazorra-Manzano vd., 2017).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada hammadde olarak kuru dut ve kuru dut yaprağı kullanılmıştır. Bu materyaller Elazığ bölgesinden 2018 yılı Temmuz-Ağustos döneminde aynı ağaçların meyvesi ve yaprağı olacak şekilde toplanıp örneklerin hepsine güneşte kurutma işlemi uygulanmıştır.

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

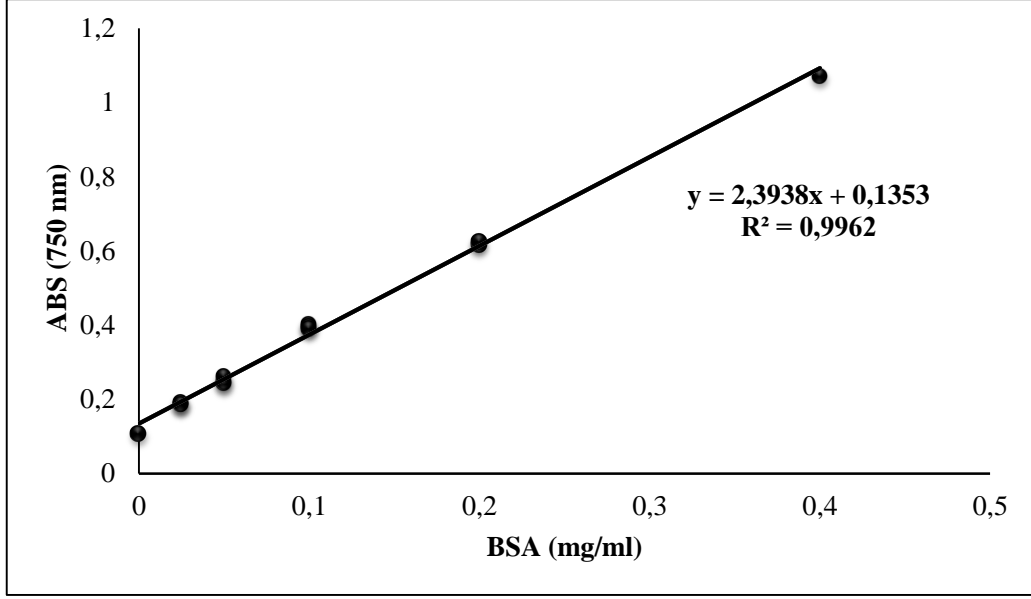
Anjiyotensine Converting Enzyme (ACE-tavşan akciğeri ekstraktı) (A6778), Hippuryl-histidyl-leucine (HHL, Sigma-Aldrich), Sodyum hidroksit (NaOH) (M106462), Hidroklorik asit (HCl) (H1758), Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (M106345), di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat (M106580), Pepsin (from porcine gastric mucosa, powder, ≥ 250 units/mg solid) (P7000), Tripsin (Treated, essentially salt-free, lyophilized powder, $\geq 10,000$ BAEE units/mg protein) (T1426), Kimotripsin (α -Chymotrypsin from bovine pancreas, salt-free, lyophilized powder) (C6423), Alkalaz (≥ 5 U/g, 30079 (5g'lık)) (30079), N-Hippuryl-His-Leu hydrate powder (H1635), ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit)) solüsyonu, Bovine Serum Albumin (lyophilized powder, $\geq 96\%$), folin (suitable for determination of total protein by Lowry method, 2 N) (F9252).

3.2. Yöntem

3.2.1. Ön denemeler: izoelektrik noktanın belirlenmesi

Protein ekstraktlarını maksimum verimle elde etmek için ön denemeler yapılmıştır. Ön denemelerin ardından belirlenen parametrelerle ekstrakt üretimi gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin izoelektrik noktasını belirleyebilmek amacıyla farklı pH değerlerinde (pH:2-3-4-5-6-7-8-9-10) su ile özütlemeye yapılarak protein çözünürlükleri incelenmiştir. Çözünür protein miktarının belirlenmesi amacıyla Lowry metodu uygulanmıştır. Standart eğrinin hazırlanmasında 0-0.4 mg/mL konsantrasyon aralıklarında fosfat tamponuyla seyreltilmiş sığır serum albümin (BSA) kullanılmıştır ve 750 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Elde edilen absorbans sonuçları ile bir standart kalibrasyon grafiği (Şekil 3.1) hazırlanmıştır.



Şekil 3.1: Çözünür protein miktarı için BSA kalibrasyon grafiği.

Farklı pH'lardaki örneklerden elde edilen sonuçlara göre minimum çözünürlük olan pH değeri izoelektrik nokta olarak seçilmiştir ve alkali bölgede maksimum çözünürlük olan pH değerinde alkali özütleme işlemi yapılmıştır.

3.2.2. Protein ekstraksiyonu

Dut ve dut yaprağı örneklerinden protein ekstraktı eldesi literatürdeki birkaç yöntemin modifiye edilmesiyle oluşturulmuştur (Yang vd., 2012; Pothinuch vd., 2017; Mirzapour vd., 2016).

Dut ve dut yaprağı örneklerinden alkali özütleme ve izoelektrik çöktürme yöntemiyle protein ekstraktı üretilmiştir.

3.2.2.1. Isıl işlem uygulanan örnekler protein ekstraksiyonu uygulaması

Kuru dut ve kuru dut yaprağı örnekleri öncelikle laboratuvar değirmeninde öğütülmüş ve öğütülen dut ve dut yaprağı örnekleri bir beherin içinde 1/10 (g/mL) oranında distile suyla süspansiyon oluşturulmuştur. Sulandırılmış örnekler mikser (Ultra Turrax T25 - Janke & Kunkel KG, IKA, WERK, GERMANY) yardımıyla 3 dk boyunca homojenize edilmiştir. Ardından her bir örneğe farklı derecede sıcaklık (50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C ve 90°C) uygulanarak, örnekler sıcaklık kontrollü ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde 1 saat boyunca ısıtma işlemine tabi tutulmuştur.

Isıl işlem uygulanan örnekler, 1 M NaOH ile ön denemeler sonucunda bulunan alkali özütlenme noktasına (pH: 9) ayarlanarak proteinler çözünür forma getirilmiştir. Manyetik karıştırıcıyla homojen bir karışım elde edilene kadar (1 saat) ekstraksiyon işlemine devam edilmiştir. Ardından 3.000xg'de 30 dakika boyunca (4 °C) santrifüj işlemiyle çözünmeyen katı partiküllerin ayrılması sağlanmıştır.

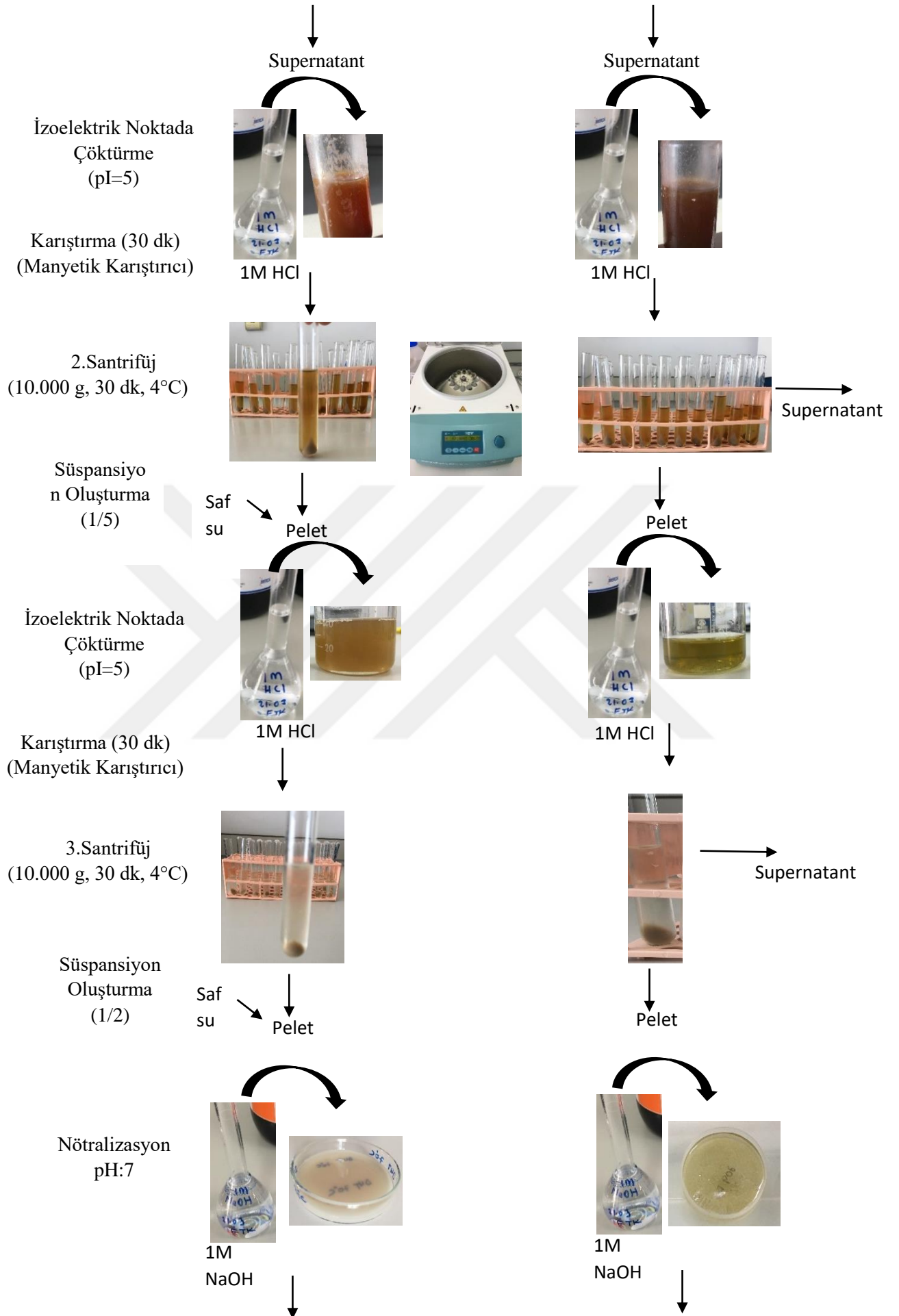
Sonrasında supernatant alınarak pH'sı, örneğin izoelektrik noktasına (pI: 5) 1 M HCl kullanılarak ayarlanmıştır ve manyetik karıştırıcıda homojen bir karışım elde edilene kadar (30 dk) ekstraksiyon işlemine devam edilmiştir. Daha sonra karışıma 10.000xg'de 30 dakika boyunca (4 °C) santrifüj işlemi uygulanarak supernatant ve pelet birbirinden ayrılmıştır.

Pelet 1:5 oranında distile su ile süspansiyon edilip pH'sı pI'ya ayarlanarak 30 dakika karıştırılmak suretiyle yıkanmıştır. Aynı şartlarda tekrar santrifüjlenerek elde edilen çökelti alınıp 1:2 oranında su ile süspansiyon edilip nötralizasyonu sağlamak amacıyla 1M NaOH ile pH'sı 7'ye ayarlanmıştır.

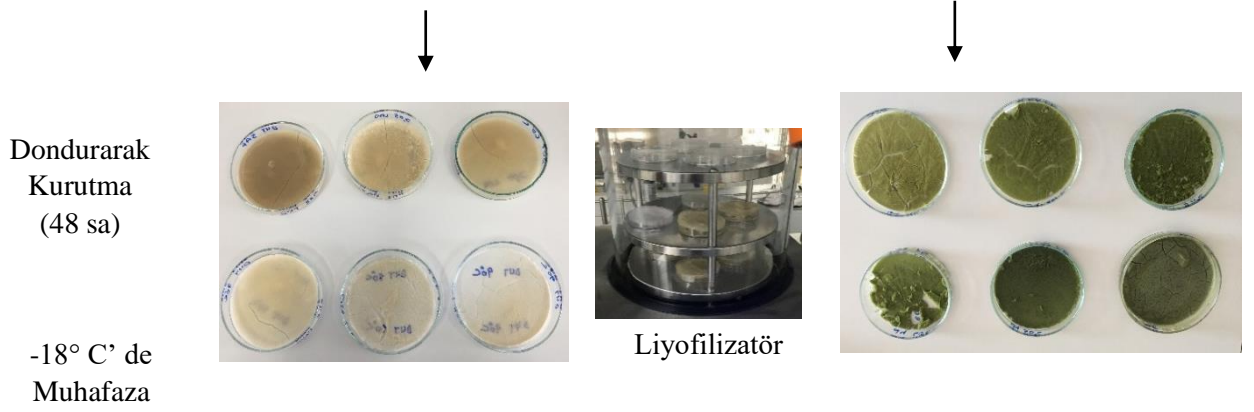
Liyofilizatörde 48 saat dondurularak kurutulan konsantre protein örnekleri -18° C 'de analiz edilene kadar muhafaza edilmiştir. Şekil 3.2'de ısıl işlem uygulanan örnekler için protein ekstraktı eldesi akım şeması bulunmaktadır.



Şekil 3.2: Isıl işlem uygulanan örnekler için protein ekstraktı eldesi akım şeması.



Şekil 3.2 (devam): Isıl işlem uygulanan örnekler için protein ekstraktı eldesi akım şeması.



Şekil 3.2 (devam): Isıl işlem uygulanan örnekler için protein ekstraktı eldesi akım şeması.

3.2.2.2. Isıl işlem uygulanmayan örneklere protein ekstraksiyonu uygulaması

Isıl işlem uygulanmayan örneklerin protein ekstraksiyonunu yapabilmek için Bölüm 3.2.2.1’de belirtilen yöntemin aynısı kullanılmıştır. Sadece ilk kısımda homojenizasyon işleminden sonra ısıl işlem uygulanmayarak alkali özütleme aşamasına geçilmiştir.

3.2.2.3. Protein ekstraksiyon veriminin hesaplanması

Dut ve dut yaprağı örneklerinden elde edilen protein ekstraktlarının verim hesabını yapabilmek için Bölüm 3.2.5.1’ de belirtilen mikro Kjeldahl yöntemi kullanılmıştır.

3.2.3. Proteinlerin enzimatik hidrolizasyonu

Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarından enzim kullanılarak protein hidrolizatı eldesi literatürdeki birkaç yöntemin modifiye edilmesiyle oluşturulmuştur (Arimboor ve Arumughan, 2011; Wang vd., 2011).

Hidrolizasyon işlemi iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada farklı enzimlerle, protein ekstraksiyon verimi en yüksek dut ve dut yaprağı örnekleri hidrolize edilmiş ve en yüksek aktivite gösteren enzime karar verilmiştir. İkinci aşamada ise seçilen enzimle bütün protein ekstraktlarına hidroliz işlemi uygulanmıştır.

3.2.3.1. Enzim seçimi

Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının hidroliz reaksiyonunun optimizasyonunda kullanılacak uygun enzimi belirleyebilmek amacıyla dört farklı ticari enzim (pepsin, tripsin, kimotripsin ve alkalaz) kullanılarak enzimlerin optimum düzeyde aktivite gösterecekleri sıcaklık ve pH aralıklarında çalışılarak ön denemeler gerçekleştirilmiş ve Bölüm 3.2.5.2' de belirtilen Cd-Ninhidrin yöntemi kullanılarak enzimlerin hidroliz etkinlikleri belirlenmiştir. Bu amaçla protein ekstraksiyon verimi en yüksek dut ve dut yaprağı örnekleri belirlenerek enzim seçimi bu örneklerle uygulanmıştır.

Protein hidrolizatı eldesi Şekil 3.3'te belirtilmiştir; 1 mg protein ekstraktı/ 1 mL tampon konsantrasyonunda protein izolatu içeren süspansiyon karışımı hazırlanmıştır. Süspansiyon karışımının hazırlanması amacıyla tampon çözeltileri hazırlanmıştır (Pepsin için= pH:2.1 - 20mM - HCl-KCl tamponu; Tripsin, Kimotripsin için= pH:7.8 – 20 mM – fosfat tamponu; Alkalaz için= pH:8 -20mM -fosfat tamponu). Protein ekstraktı içeren süspansiyonlara çalkalamalı su banyosunda 30 dakika boyunca ön inkübasyon yapılmıştır (Pepsin, tripsin, kimotripsin için= 37 C°'de; Alkalaz için=50 C°'de). Daha sonra Enzim/substrat oranı 1/100 olacak şekilde pepsin, tripsin, kimotripsin ve alkalaz enzimleri eklenmiştir. Hidroliz işlemi için çalkalamalı su banyosunda 30 dakika boyunca inkübasyon yapılmıştır (Pepsin, tripsin, kimotripsin için 37 C°'de; Alkalaz için 50 C°'de). Hidroliz işleminin ardından örneklerin enzim inaktivasyonu için 85°C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika bekletilmiş ve ardından buz banyosunda 10 dk boyunca soğutma işlemi yapılmıştır. Ardından 4.000g'de 15 dakika santrifuj edilerek süzütünün üst kısmı alınmış (supernatant) ve daha sonra yapılacak işlemler için -18°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2. Seçilen enzimle protein ekstraktlarına hidrolizasyon işleminin uygulanması

Protein ekstraktlarının hidroliz reaksiyonunun optimizasyonunda kullanılacak uygun enzime karar verildikten sonra bütün protein ekstraktlarına seçilen enzimle hidrolizasyon işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla Şekil 3.2.3.2.'de belirtilen protein hidrolizatı eldesi proseduru kullanılmıştır.

PROTEİN HİDROLİZATI ELDESİ AKIŞ SEMASI

Tampon Hazırlama

(Pepsin için= pH:2.1 - 20mM - HCl-KCl tamponu)
(Tripsin, Kimotripsin için= pH:7.8 – 20 mM – fosfat tamponu)
(Alkalaz için= pH:8 – 20 mM – fosfat tamponu)



Solusyon Hazırlama

(1 mg protein ekstraktı/ 1 mL tampon)



Ön İnkübasyon

(çalkalamalı su banyosu, 30 dk
(pepsin, tripsin, kimotripsin için= 37 C°)
(alkalaz için= 50 C°)



Enzim Ekleme (% 1 (w/w))



Hidroliz

(çalkalamalı su banyosu, 3 sa)
(pepsin, tripsin, kimotripsin için= 37 C°)
(alkalaz için= 50 C°)



Enzim İnaktivasyonu

(çalkalamalı su banyosu, 85 C°, 10 dk)



Soğutma (buz banyosu, 10 dk)



Santrifuj → Pelet

(4.000g, 10 dk, 4C°)



Supernatant



Protein Hidrolizatı



-18° C'de muhafaza

Şekil 3.3: Protein hidrolizatı eldesi akım şeması.

Elde edilen bütün hidrolizatların toplam serbest amino asit miktarlarının belirlenmesi amacıyla 3.2.5.2' de belirtilen Cd-Ninhidrin yöntemi kullanılmıştır.

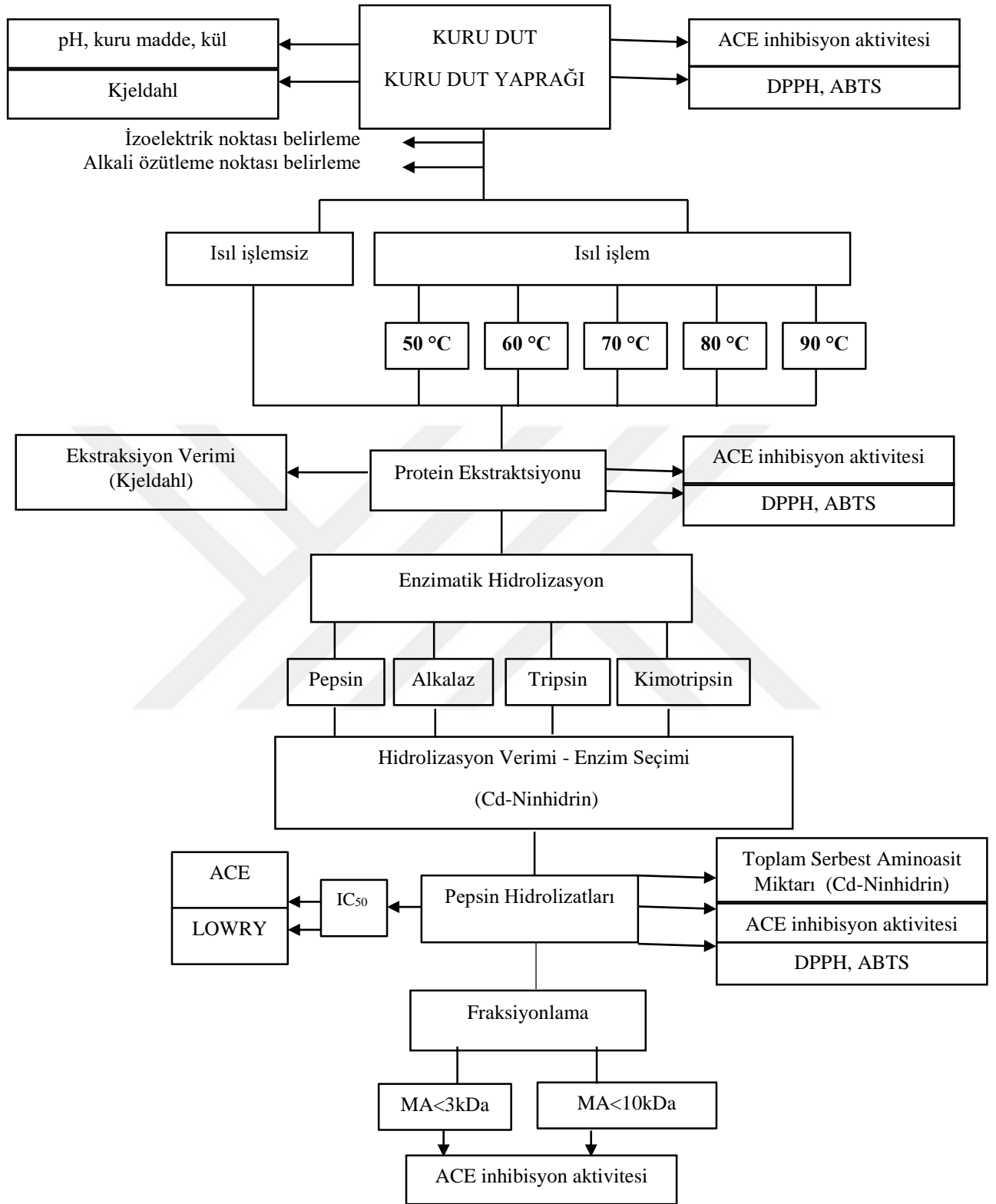
3.2.4. Hidrolizatların fraksiyonlarına ayrılması

Enzimatik hidrolizden elde edilen protein hidrolizatları ultrafiltrasyon membran filtre kullanılarak 4°C' de 7.500xg ve 30 dakika boyunca santrifuj edilmiş ve 10 kDa ve 3 kDa membran filtreler kullanılarak farklı molekül büyüklüğünde fraksiyonlar elde edilmiştir. Fraksiyonlar analize alınana kadar -18°C' de saklanmıştır (Mirzapour vd., 2017).

3.2.5. Analizler

Şekil 3.4'de tez çalışması kapsamında yapılacak analizlerin planlaması gösterilmiştir.





Şekil 3.4: Analiz planlaması.

3.2.5.1.Fizikokimyasal analizler

Kuru dut ve kuru dut yaprağı örneklerinin pH değerlerinin belirlenmesi amacıyla her numuneden 10 g alınmış ve 10 mL saf su ile karıştırılarak Ultra Turrax blenderda T25 (Janke & Kunkel KG, IKA, WERK) homojenize edilmiştir. Homejen karışımın pH'sı, (Thermo ORION 4 STAR) pH metre ile ölçülmüştür (Hayaloğlu, 2003).

Kuru dut ve dut yapraklarında kuru madde miktarları; 2-3 g tartılan örneğin etüvde sabit tartım ağırlığına ulaşınca kadar kurutulmasıyla belirlenmiştir (AOAC, 1990).

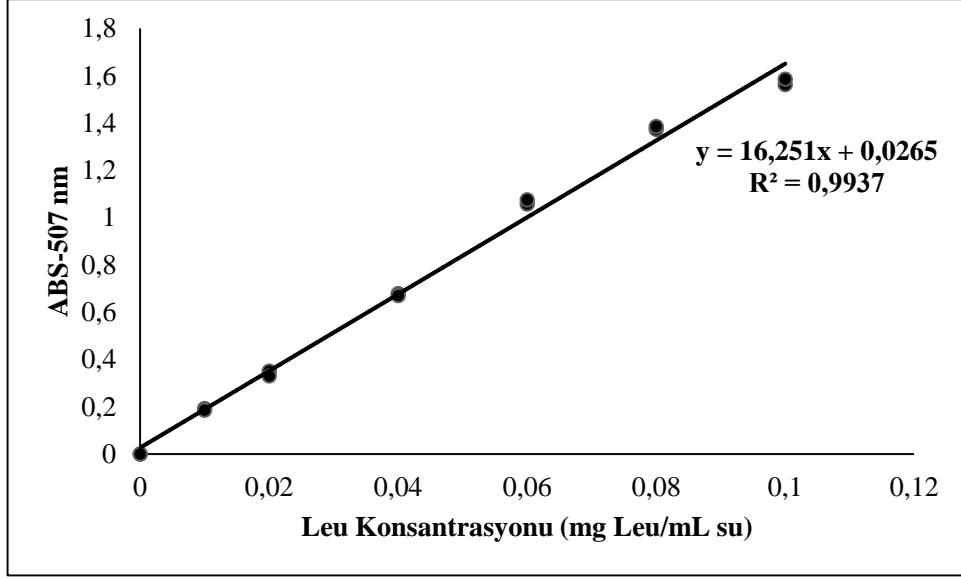
Kuru dut ve dut yaprağı örneklerinin kül miktarları; 1.5-2 g tartılan örneğin 550°C'de karbon içermeyen beyaz bir kül oluncaya kadar yakılması sonucunda belirlenmiştir (AOAC 1990).

Protein oranları ise yaş yakmaya tabi tutulan örnekler mikro Kjeldahl yöntemi ile azot miktarlarının saptanması ile bulunmuştur. Protein oranları, bulunan azotun 6.25 faktörü ile çarpılması ile hesaplanmıştır (IDF, 1993).

3.2.5.2. Kadmiyum- ninhidrin metodu

Protein hidrolizasyonunda kullanılan farklı enzimlerin hidroliz verimlerinin hesaplanması ve bütün protein hidrolizatlarının toplam serbest amino asit miktarlarının belirlenmesi amacıyla Kadmiyum- ninhidrin (Cd-Ninhidrin) metodu kullanılmıştır. Analiz, Cd-Ninhidrin çözeltisi (0.8 g ninhidrin, 80 mL etanol ve 10 mL buzlu asetik asit karışımında çözüldürüldükten sonra elde edilen karışım 1 mL suda çözüldürülmüş 1.0 g CdCl₂ ile karıştırılır) ile hazırlanan örneğin 507 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesine dayanmaktadır. Bu amaçla, tamponda çözülen hidrolizatlardan 100 µL örnek alınarak üzerine 2 mL Cd-Ninhidrin çözeltisi eklenmiştir. Karışım 84°C'de 5 dk bekletildikten sonra soğutulmuş ve 507 nm'deki absorbansı UV-spektrofotometrede okuma yapılmıştır (Sulejmani ve Hayaloğlu, 2018).

Kalibrasyon eğrisi hazırlama: Lösin (Leu) standardı suda çözülerek belirli konsantrasyonlarda hazırlanarak kullanılmıştır ve 507 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Konsantrasyon değerlerine karşılık absorbans değerleriyle kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.5). Örneklerin toplam serbest amino asit içeriklerini hesaplamak için grafiğe ait lineer regresyon denklemi bulunmuş ve örnekler için absorbans değerleri denklemde yerine konularak konsantrasyonlar belirlenmiştir. Örneklerde bulunan toplam serbest amino asit miktarları mg Leu/g kuru örnek cinsinden hesaplanmıştır.



Şekil 3.5: Lösün standardının farklı konsantrasyon değerlerine karşılık absorbans değerleriyle çizilen kalibrasyon eğrisi.

3.2.5.3. ACE inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi

Ekstraktların ACE-inhibitör aktivitesi RP-HPLC kullanılarak belirlenmiştir. Metodun temeli Hippuryl-histidyl-leucine'in ACE tarafından hidrolizi sonucu oluşan hippurik asit miktarının belirlenmesine dayalıdır. Deney karışımı 25 µL HHL çözeltisi (5 mM HHL, 100 mM sodyum fosfat tamponu, 400 mM NaCl, pH: 8.9) ile 50 µL örnek çözeltisi (1 mg örnek / 1 mL sodyum fosfat tamponu) karıştırılarak hazırlanmıştır. Daha sonra 25 µL ACE (100 mUN ACE / 1 mL sodyum fosfat tamponu) ilave edilip 37 °C sıcaklıkta çalkalamalı su banyosunda 30 dakika inkübe edilerek, inkübasyon süresi sonunda reaksiyonu durdurmak için 1 M 6,75 µL HCl ilave edilmiştir. Örnek hazırlığı tamamlandıktan sonra 228 nm'de RP-HPLC cihazı ile okumalar yapılmıştır (Şahingil vd., 2019). İnhibisyon oranı (%) aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır:

$$ACE - inhibisyon oranı = \frac{(A - B)}{B} \times 100$$

A: ACE ve HHL varlığında ve ACE-inhibitör yokluğundaki absorbans

B: ACE, HHL ve ACE-inhibitörü varlığındaki absorbans

3.2.5.3.1. IC₅₀ değerinin belirlenmesi

Örneklerin ACE-inhibisyon aktivitesi, IC₅₀ değeri (ACE'nin en az %50'sini inhibe edebilecek biyo-aktif peptit düzeyi) ile de ifade edilmiştir. IC₅₀ değeri, farklı protein konsantrasyonlarına karşı (1/5 – 1/10 – 1/25 – 1/50 – 1/75 – 1/100 – 1/125)(mg örnek/ mL su) ACE-inhibisyon değerlerinin bulunarak grafik üzerinde ekstrapolasyonu ile hesaplanmıştır. Örneklerin protein içerikleri Bölüm 3.2.5.3.2' de bahsedilen Lowry metoduna göre belirlenmiştir. Ardından, IC₅₀ değerleri ACE aktivitesinin %50'sinin inhibe olduğu protein konsantrasyonundaki lineer regresyon kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.5.3.2. Çözünür protein miktarının belirlenmesi

Çözünür protein miktarının belirlenmesi amacıyla örneklere Lowry metodu uygulanmıştır (Lowry vd. 1951). Bu yöntem alkali ortamda bakırın peptitlerle verdiği reaksiyon ve oluşan kompleksin folin-cioceltea Lowry çözeltisi ile reaksiyonu sonunda mavi-yeşil bir renk vermesi prensibine dayanmaktadır.

Lowry metodu ile protein tayini yapmak amacıyla aşağıda belirtilen şekillerde çözeltiler hazırlanmıştır:

A ayıracı: 20g Na₂CO₃ + 1 L'lik 0.1N NaOH çözeltisinde çözülmüştür.

B ayıracı: 0.5 g CuSO₄.5H₂O + 100 mL'lik %1'lik(ağırlık/hacim) Na-K Tartarat çözeltisinde çözülmüştür.

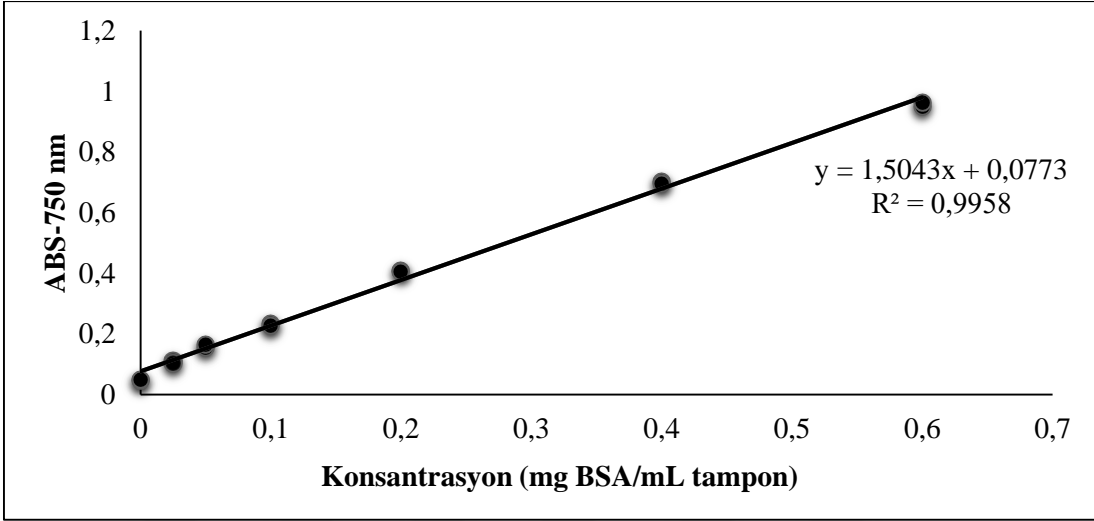
C ayıracı: Kullanımdan hemen önce 100 mL A ayıracı + 2 mL B ayıracı karıştırılmıştır.

D ayıracı: Folin-cioceltea Lowry maddesi 1:1 oranında saf su ile seyreltilmiştir. Kullanıma kadar koyu renkli şişede buzdolabında saklanmıştır.

Örnekler 1 mg/mL'yi geçmeyecek şekilde fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Deney tüplerine alınan 1 mL'lik örneklerin üzerine 5 mL C ayıracı ilave edilmiş ve 10 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. 10 dk sonunda deney tüplerine 0.5 mL D ayıracı ilave edilmiş, 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Absorbans değeri 750 nm'de referans çözeltisine karşı okunmuştur. Referans çözeltisi için 1 mL örnek yerine 1 mL fosfat tamponu kullanılmıştır.

Kalibrasyon eğrisi hazırlama: Sığır serum albümini (BSA) fosfat tamponu çözeltisinde çözümlenerek belirli konsantrasyonlarda hazırlanmış ve standart olarak kullanılmıştır. 750 nm'de UV-Spektrofotometre ile okuma yapılmıştır. Konsantrasyon değerlerine karşılık

absorbans değerleriyle kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (şekil 3.6) . Protein konsantrasyonunu hesaplamak için grafiğe ait lineer regresyon denklemi bulunmuş ve örneklere ait absorbans değerleri denklemde yerine konularak konsantrasyonlar belirlenmiştir.



şekil 3.6: BSA zeltisinin farklı konsantrasyon değerlerine karşılık absorbans değerleriyle çizilen kalibrasyon eğrisi.

3.2.5.4. Antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

3.2.5.4.1. ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit)) radikal katyonlarını süpürme analizi

Spektrofotometrik bir analiz olan antioksidan aktiviteyi belirlemek amacıyla ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)) radikal katyonlarını süpürme analizi Jha vd. (2014) belirledikleri metodun modifiye edilmesiyle kullanılmıştır. Metodun temeli, antioksidan maddelerin ABTS radikal katyonunu 734 nm de mavi/yeşil kromofor ile karakteristik bir absorbans vererek süpürmesi esasına dayanır. ABTS radikal katyonu, suyla hazırlanmış 7mmol/L ABTS solüsyonuna 2.45 mmol/L potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) eklenmesiyle elde edilmiştir. Kararlı radikaller üretmek için hazırlanan karışım koyu renkli bir şişede 16 saat boyunca oda sıcaklığında ($25^\circ C$) saklanmıştır. Kullanmadan nce ABTS radikal solüsyonu 734 nm de 0.750 ± 0.025 absorbans elde etmek amacıyla sodyum fosfat tamponuyla (0.1 mol/L, pH 7.4) seyreltilmiştir. Daha sonra 2 mL ABTS solüsyonuna 1 ml örnek gruplarından eklenerek 30 dk beklenmiş, ardından UV-Spektrofotometre ile 734 nm de absorbans değerleri okunmuştur.

Örneklerin inhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitliğe göre belirlenir.

$$\% \text{Inhibisyon} = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100$$

A_0 : 734 nm deki kontrol absorbanı

A: 734 nm deki örneklerin absorbanı

3.2.5.4.1. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme analizi

Örneklerin serbest radikal giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlenmiştir. DPPH molekülünde bir serbest elektronun yer değiştirmesi menekşe renginin oluşumuna sebep olur. DPPH solüsyonu hidrojen atomu verebilen bir madde (antioksidan) ile karıştırıldığı zaman koyu menekşe rengin kaybolması ile indirgenmiş form oluşur. Antioksidanlar tarafından DPPH serbest radikale proton aktarılması reaksiyonu 525 nm'de absorbanın azalmasına neden olur. Bu süreç görünür alanda spektrofotometre ile absorbanı sabitlenene kadar takip edilerek anlaşılır (MacDonald-Wicks vd., 2006).

İçerisinde 1 mL örnek çözeltisi (0.2-1.0 mg/mL) bulunan tüplere 1 mL etanolde hazırlanmış DPPH çözeltisi (son derişim 0.2 mM) ilave edilmiştir. Kontrol için 1 mL etanol/su konulmuştur. Örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra UV-Spektrofotometre ile 525 nm'de absorbanları ölçülmüştür. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Burada; A_{kontrol} kontrolün absorbanı ve $A_{\text{örnek}}$ ise örneğin absorbanını ifade etmektedir.

3.2.6. İstatistiksel analizler

Beyaz dut ve yapraklarına uygulanan deneyler en az iki tekerrür ve her tekerrür için üç paralel olarak yapılmıştır. Beyaz dut ve yapraklarına yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler arasındaki farkların önem düzeyi varyans analizi (One-way ANOVA) ile saptanmış ve farklılık “SPSS for Windows (Version 22)” paket programı kullanılarak % 95 güven aralığında Duncan post-hoc testleri ile değerlendirilmiştir. Farklı grupların istatistiksel anlamda önem düzeyleri “a, b, c...” olacak şekilde harflendirilerek belirtilmiştir. Bu harfler Duncan testinde oluşan grup sayısına göre, yüksek değerden başlayarak en düşük değere doğru sıralanmıştır. Sonuçlardan herhangi biri aynı anda iki grupta yer almışsa “ab”, “bc” gibi bir indisle bu durum belirtilmiştir.



4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Fizikokimyasal Analizler

Kuru dut ve dut yaprağı örneklerinin fizikokimyasal analiz sonuçları kuru ağırlık üzerinden Çizelge 4.1' de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Kuru dut ve kuru dut yaprağı örneklerinin fizikokimyasal özellikleri.

Analiz	Dut	Dut Yaprığı
protein (%)	3.48±0.2	9.18±0.31
pH	5.85±0.007	7.31±0.28
kuru madde (%)	93.92±0.014	94.74±0.05
kül (%)	4.16±0.141	3.78±0.001

Sonuçlar; ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Kuru dut örneğine ait sonuçlara bakılacak olursa kuru madde miktarı % 93.92±0.014, protein miktarı % 3.48±0.2, kül miktarı % 4.16±0.141 ve pH değeri 5.85±0.007 olarak bulunmuştur.

Kuru dut yaprağı örneklerine ait sonuçlar incelendiğinde ise; kuru madde miktarı % 94.74±0.05, protein miktarı % 9.18±0.31, kül miktarı % 3.78±0.001 ve pH değerinin 7.31±0.28 olduğu bulunmuştur.

Farklı dut genotiplerinin beslenme kalitesi üzerine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada kuru dut meyvesinin protein içeriği % 4.72-9.96 ve kuru dut yaprağının protein içeriği % 15.31-30.91 olarak bulunmuştur (Srivastava vd., 2006).

Dut kurusunun fiziksel ve kimyasal özellikleri ile ekstraksiyon koşullarının araştırıldığı bir çalışmada toplam kuru madde % 91.20, pH 5.13 ve toplam kül miktarı % 2.95 olarak bulunmuştur (Bakkalbaşı vd., 2004).

Beyaz dutun üretim potansiyelinin ve yaprak kalitesinin araştırıldığı bir çalışmada yaprakların toplam protein içerikleri % 9.8-27.31 aralığında bulunmuştur (Kumar vd., 2018).

Slovenya bölgesinde ipekçilikte kullanılan eski dut ağaçlarının (*Morus Alba L.*) morfometrik ve biyokimyasal taramasının yapıldığı bir çalışmada dut yapraklarının yüksek protein içeriğine sahip olduğu bulunmuştur (20.2 g/100 g kuru ağırlık) (Urbanek Krajnc vd., 2019).

Çalışmada elde edilen sonuçlar ve literatür bilgileri kıyaslandığında dut ve dut yaprağı örneklerinin fizikokimyasal özelliklerinin bir takım farklılıklarla birlikte benzer olduğu

görülmektedir. Bu farklılıkların sebebi coğrafi ve iklim değişiklikleri veya genotip farklılıkları olabileceği düşünülmektedir.

4.2.Ön Denemeler: İzoelektrik Noktanın Belirlenmesi

Protein ekstraktlarını maksimum verimle elde edebilmek için dut ve dut yaprağı örneklerine ön denemeler yapılmıştır. Bu amaçla örneklerin izoelektrik noktasını belirleyebilmek için farklı pH değerlerinde (pH:2-3-4-5-6-7-8-9-10) sulu çözeltiler hazırlanıp özütleme yapılarak protein çözünürlükleri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2' de belirtilmiştir.

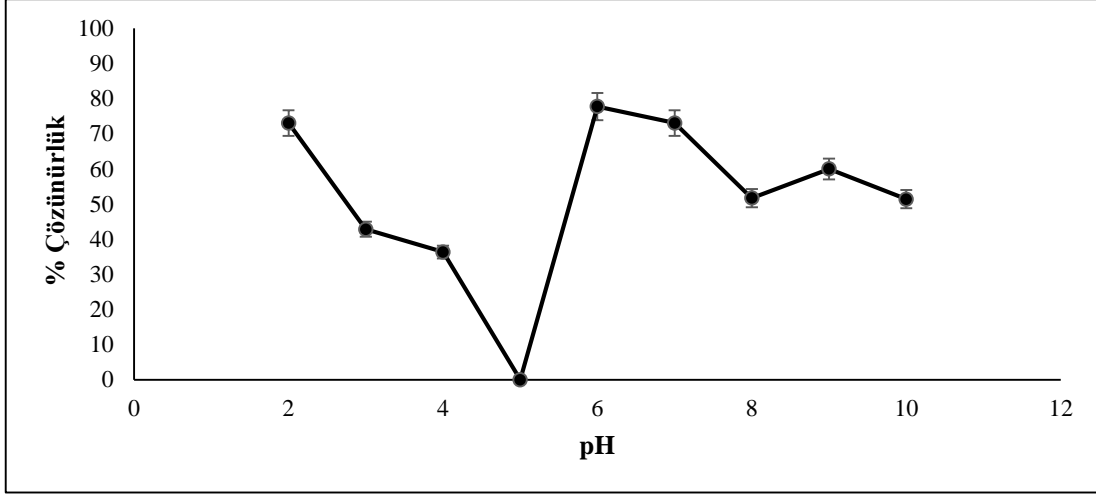
Çizelge 4.2: Dut ve dut yaprağı örneklerinin farklı pH' larda % çözünürlük değerleri.

pH	% Çözünürlük	
	Dut	Dut Yaprığı
2	73.1±0.02	62.4±0.007
3	42.9±0.012	66.4±0.014
4	36.4±0.002	45.3±0.024
5	0.0±0.003	0.0±0.008
6	77.8±0.004	42.3±0.024
7	73.1±0.014	39.7±0.006
8	51.7±0.006	39.7±0.001
9	60.0±0.001	47.8±0.023
10	51.4±0.003	43.1±0.015

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

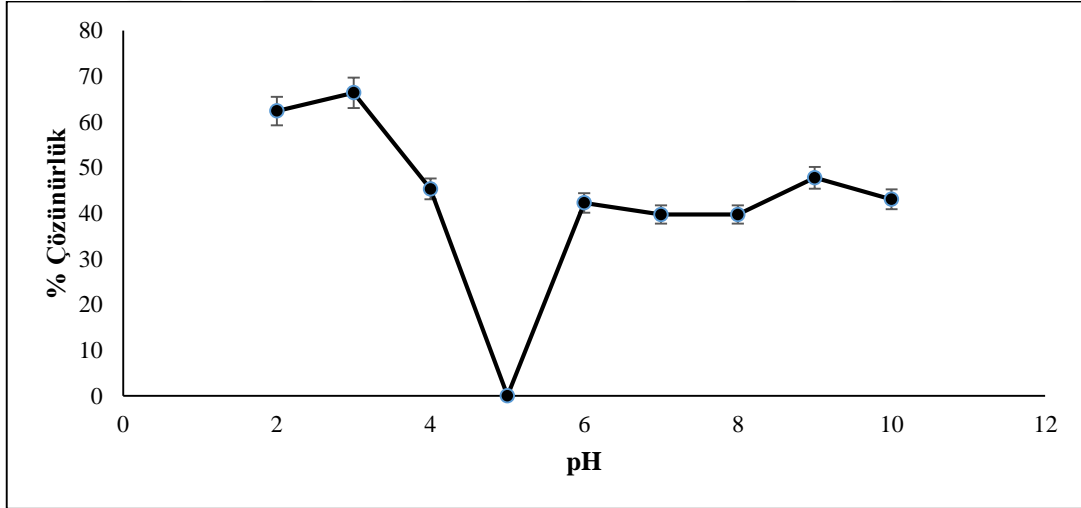
Proteinler izoelektrik noktalarında çok düşük çözünürlük özelliği gösterirler. Protein, izoelektrik noktasında yani zwitter iyon konumunda iken yüksüz durumdadır ve elektriksel alanda kutuplara doğru hareket edemez (Saldamlı, 2007).

Yapılan çalışmada dut örneklerinin farklı pH' lardaki çözünürlüklerini ifade eden grafiğe (Şekil 4.1) bakıldığında en düşük çözünürlüğün izoelektrik noktaya yakın olan pH 5'de olduğu görülmüştür. Asidik ortama gidildikçe dut örneğinde çözünürlük %73.1±0.021'e kadar çıkmış, alkali ortama gidildikçe ise çözünürlük en fazla pH 9'da %60.0±0.001'a ulaşmıştır.



Şekil 4.1: Dut örneklerinin farklı pH değerlerinde % çözünürlük grafiği.

Dut yaprağı örneklerine ait grafik incelendiğinde (Şekil 4.2) ise dut örnekleriyle paralel şekilde en düşük çözünürlüğün izoelektrik noktaya yakın olan pH 5'de olduğu görülmüştür. Asidik ortama gidildikçe dut yaprağı örneğinde çözünürlük %66.4±0.014'e kadar çıkmış, alkali ortama gidildikçe ise çözünürlük en fazla pH 9'da %47.8±0.023'e ulaşmıştır.



Şekil 4.2: Dut yaprağı örneklerinin farklı pH değerlerinde % çözünürlük grafiği.

Karabuğdayda bulunan ACE inhibitörü peptitlerin saflaştırılması ve tanımlanmasının yapıldığı bir çalışmada protein ekstraktlarını elde etmek amacıyla alkali özütleme noktası pH 9 ve izoelektrik nokta pI 4.5 olarak belirlenmiştir (Ma vd., 2006).

Maş fasulyesinden izole edilen peptitlerin ACE inhibisyon aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada pH 4.6'da proteinlerin çöktürme işlemi sağlanmıştır (Li vd., 2006).

Ispanakgiller ailesinden bir türün proteinlerinin in vivo ve in vitro koşullarda ACE inhibisyon aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada alkali özütleme pH 9'da ve proteinleri çöktürme işlemi pH 5'de sağlanmıştır (Fritz vd., 2011).

Horoz ibiği çiçeği proteinlerinin ve peptitlerinin antioksidan aktivitelerinin analiz edildiği bir çalışmada proteinlerin pH 9'da alkali özütlemesi yapılarak pH 5'de izoelektrik çöktürmesi yapılmıştır (Tironi ve Anon, 2010).

Yapılan çalışma sonuçları literatür ile kıyaslandığında farklı gıda kaynaklarının izoelektrik ve alkali özütleme noktalarıyla örneklerin benzer olduğu görülmektedir.

Daha sonraki aşamalarda bütün örneklerin protein ekstraksiyonunu maksimum verimle elde edebilmek için belirlenen parametreler (alkali özütleme noktası; pH:9 ve izoelektrik nokta; pI:5) kullanılmıştır.

4.3. Protein Ekstraksiyon Veriminin Belirlenmesi

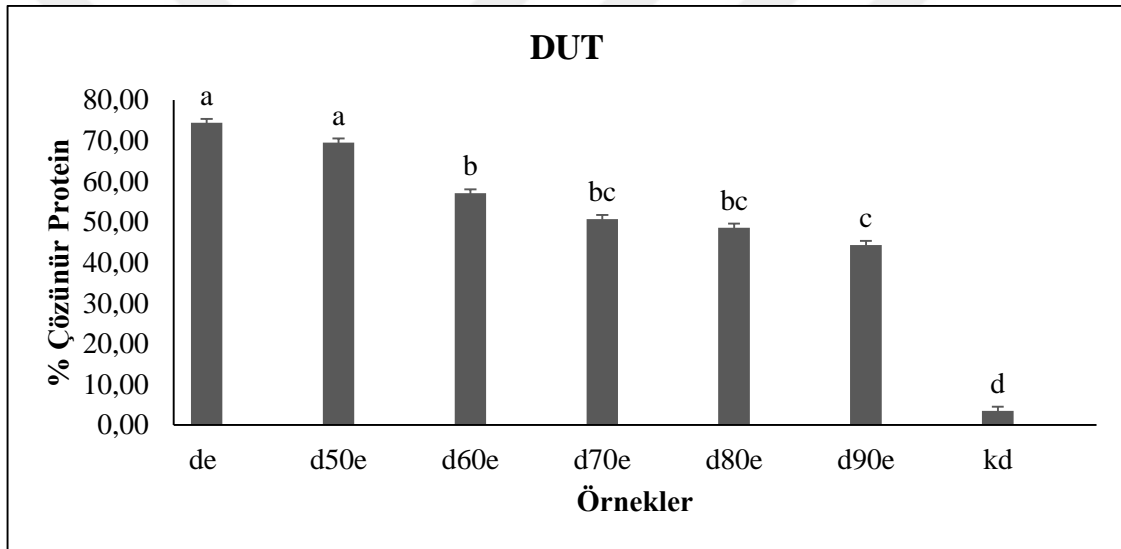
Dut ve dut yaprağı örneklerinden alkali özütleme ve izoelektrik çöktürme yöntemiyle protein ekstraktı üretimi sağlanmıştır. Protein ekstraktı, protein oranı gerçekte gıdanın içinde mevcut bulunan değere göre artırılmış örneği ifade etmektedir. Ekstraksiyon verimini belirleyebilmek amacıyla bütün örneklerin çözünür protein değerleri bulunmuş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3' de belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının % çözünür protein değerleri.

Dut		Dut yaprağı	
Örnek	% Protein	Örnek	% Protein
de	74.36±0.35 ^a	dye	90.62±0.04 ^a
d50e	69.51±0.34 ^a	dy50e	89.79±0.13 ^a
d60e	57.03±0.32 ^b	dy60e	81.58±0.33 ^b
d70e	50.66±0.05 ^{bc}	dy70e	70.99±0.38 ^c
d80e	48.58±0.71 ^{bc}	dy80e	69.83±0.02 ^c
d90e	44.33±0.48 ^c	dy90e	64.39±0.07 ^d
kd	3.48±0.02 ^d	kdy	9.18±0.03 ^e

Sonuçlar; ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0.05$). Dut örneklerine ait isimlendirme; **de**: ısıtılmış işlem uygulanmayan örneğin protein ekstraktı, **d50e**: 50°C' de ısıtılmış işlem uygulanan örneğin protein ekstraktı, **d60e**: 60°C' de ısıtılmış işlem uygulanan örneğin protein ekstraktı, **d70e**: 70°C' de ısıtılmış işlem uygulanan örneğin protein ekstraktı **d80e**: 80°C' de ısıtılmış işlem uygulanan örneğin protein ekstraktı **d90e**: 90°C' de ısıtılmış işlem uygulanan örneğin protein ekstraktı **kd**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan) Dut yaprağı örneklerine ait isimlendirme; **dye**: ısıtılmış işlem uygulanmayan örneğin protein ekstraktı, **dy50e**: 50°C' de ısıtılmış işlem uygulanan örneğin protein ekstraktı, **dy60e**: 60°C' de ısıtılmış işlem uygulanan örneğin protein ekstraktı, **dy70e**: 70°C' de ısıtılmış işlem uygulanan örneğin protein ekstraktı **dy80e**: 80°C' de ısıtılmış işlem uygulanan örneğin protein ekstraktı **dy90e**: 90°C' de ısıtılmış işlem uygulanan örneğin protein ekstraktı **kdy**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan)

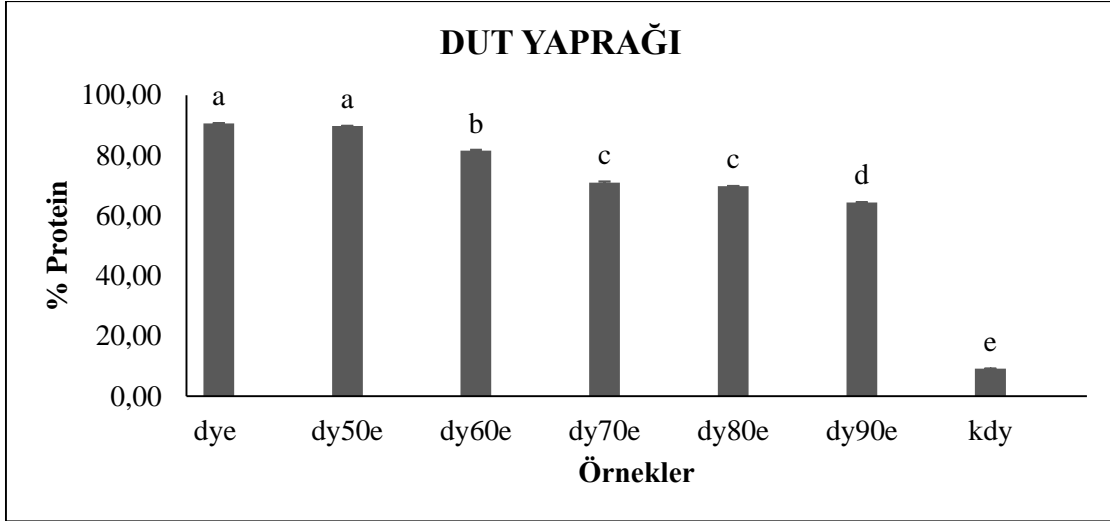
Kuru dut örneği ve dut protein ekstraktlarının % çözümlü protein miktarlarını gösteren Şekil 4.3 incelendiğinde; hiçbir işlem uygulanmayan kuru dut örneğinin protein miktarı % 3.48 ± 0.02 olarak bulunmuştur. Isıl işlem uygulanmayan dut protein ekstraktının ekstraksiyon verimi % 74.36 ± 0.35 olarak bulunmuştur. Isıl işlem uygulanan ekstraktlara bakıldığında en yüksek oranın 50°C 'de ısıl işlem uygulanan ekstraktta (% 69.51 ± 0.34) olduğu ve bu değerun ısıl işlem uygulanmayan ekstraktla istatistiksel olarak farklı olmadığı bulunmuştur ($P < 0.05$). Sıcaklık şiddeti arttıkça ekstraksiyon veriminin azaldığı görülmektedir. Ancak kuru dut örneği ile kıyaslandığında ısıl işlem uygulamasının bütün örneklerde ekstraksiyon verimini istatistiksel derecede arttırdığı görülmektedir ($P < 0.05$). En düşük ekstraksiyon veriminin 90°C 'de ekstrakte edilen dut örneğine ait olmasına rağmen bu değer bile kuru dut örneğinin protein değerinden 12.7 kat daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3: Dut protein ekstraktlarının % çözümlü protein değerleri.

Kuru dut yaprağı örneği ve dut yaprağı protein ekstraktlarının % çözümlü protein miktarlarını gösteren Şekil 4.4 incelendiğinde; hiçbir işlem uygulanmayan kuru dut yaprağı örneğinin protein miktarı % 9.18 ± 0.03 olarak bulunmuştur. Isıl işlem uygulanmayan protein ekstraktının ekstraksiyon verimi % 90.62 ± 0.04 olarak bulunmuştur. Isıl işlem uygulanan ekstraktlara bakıldığında en yüksek verimin 50°C 'de ısıl işlem uygulanan ekstraktta (% 89.79 ± 0.13) olduğu ve bu değerun ısıl işlem uygulanmayan ekstraktla istatistiksel olarak farklı olmadığı bulunmuştur ($P < 0.05$). Sıcaklık şiddeti arttıkça ekstraksiyon veriminin azaldığı görülmektedir. Ancak kuru dut yaprağı örneği ile kıyaslandığında ısıl işlem uygulamasının bütün örneklerde ekstraksiyon verimini istatistiksel derecede arttırdığı

anlaşılmıştır ($P<0.05$). En düşük ekstraksiyon verimi 90°C 'de ekstrakte edilen dut yaprağı örneğine ait olmasına rağmen bu değer bile kuru örneğin protein değerinden 7 kat daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 4.4: Dut yaprağı protein ekstraktlarının % çözümlü protein değerleri.

Dut ve dut yaprağı örnekleri birbirleriyle kıyaslandığında ısı işlem uygulamasının protein miktarına olan etkisinin dut örneklerinde daha fazla olduğu, dut yaprağı ekstraktlarının ısı işleme daha dayanıklı olduğu görülmektedir ($P<0.05$).

Genel olarak literatürde protein ekstraktı eldesi ile alakalı yapılan çalışmalarda elde edilen ekstraktın protein oranı %60-90 arasında olduğunda protein konsantresi olarak tanımlanırken; protein oranı % 90 ve daha üzerinde olduğunda protein izolatu olarak tanımlanmaktadır. Yapılan çalışmanın sonuçlarına bakılacak olursa ısı işlem uygulanmayan ve 50°C 'de ısıtılarak ekstrakte edilen dut örneklerinin protein konsantresi olarak değerlendirilebileceği görülmektedir. Dut yaprağı örneklerine bakıldığında ise bütün ısı işlem uygulanan örneklerin protein konsantresi ve ısı işlem uygulanmayan örneğin protein izolatu olarak değerlendirilebileceği anlaşılmıştır.

Nohut ve kuru fasulye ile yapılan bir çalışmada kuru baklagillerin pişirilmesi neticesinde protein miktarlarında azalma olduğu görülmüştür. Buna sebep olan etmenin ise pişirme sırasında suda çözülebilir katılarda meydana gelen kayıplar olabileceği belirtilmiştir (Wang vd., 2010).

Isıl işlem uygulamasının protein miktarına olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada şeftali örnekleri 46°C’ de sıcak hava ile muamele edilmiş ve 44 saat boyunca protein değerleri ölçülmüştür. Sonuç olarak ısıtmanın başlangıcında çözümlü protein miktarının bir miktar arttığı ancak zamanla istatistiksel derecede (% 40 oranında) azalma olduğu belirtilmiştir (Zhou vd., 2015).

Yapılan çalışmanın sonuçları literatürle kıyaslandığında benzer bir durum olduğu görülmektedir. Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarına bakıldığında ısıl işlem uygulanmayan ve 50 °C’de ısıtılarak ekstrakte edilen örneklerin ekstraksiyon verimi çok yüksekken sıcaklık derecesi arttıkça bu verimin düştüğü görülmektedir. Bu durumun nedeni, ısıtma sırasında suda çözümlü proteinlerde meydana gelen kayıplar olabileceği düşünülmektedir.

4.4. Protein Hidrolizasyon Veriminin Belirlenmesi

4.4.1. Enzim seçimi

Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının hidroliz reaksiyonunun optimizasyonunda kullanılacak uygun enzimi belirleyebilmek amacıyla dört farklı enzim (pepsin, tripsin, kimotripsin ve alkalaz) kullanılarak hidroliz etkinlikleri belirlenmiştir.

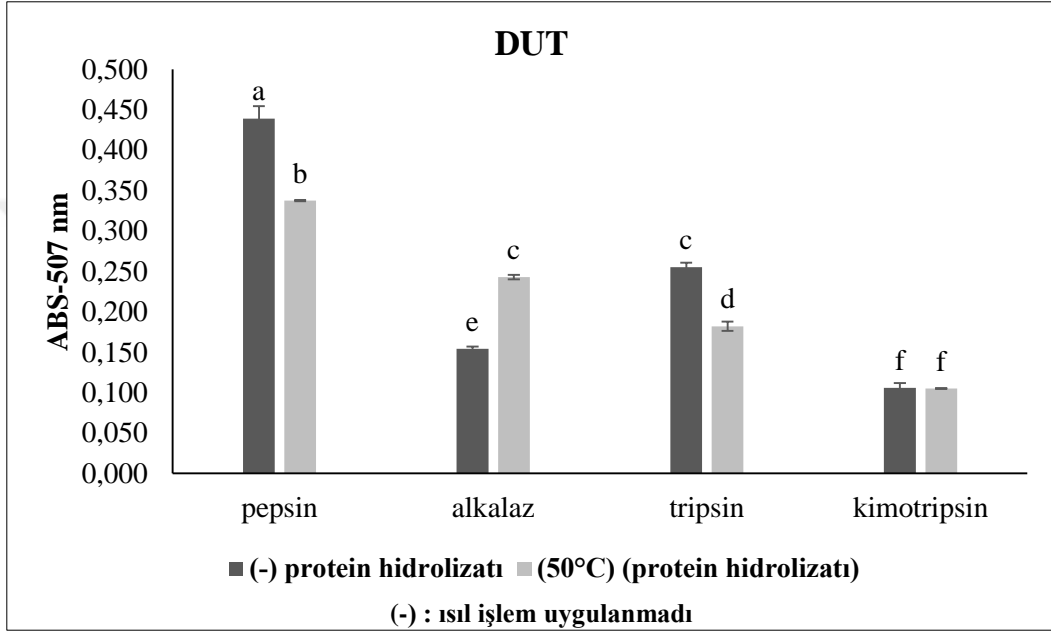
Ayrıca bütün protein ekstraktlarına ön deneme yapmak yerine, Bölüm 4.3. Protein Ekstraksiyon Veriminin Belirlenmesi kısmında hesaplanan protein ekstraksiyon verimi en yüksek örnekler (ısıl işlem uygulanmayan ve 50°C’de ısıl işlem uygulanan dut- dut yaprağı protein ekstraktları) seçilerek enzimatik hidroliz bu örneklerle uygulanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4’te sunulmuştur.

Çizelge 4.4: Farklı Enzimlerle Hidrolize Edilen Ekstraktların Hidrolizasyon Verimleri.

Hidroliz Şartları			Dut		Dut Yaprığı	
Uygulanan Enzim	pH	Sıcaklık (C°)	Seçilen Örnek	ABS-507 nm	Seçilen Örnek	ABS-507 nm
Pepsin	2.1	37	dh	0.439±0.016 ^a	dyh	0.600±0.001 ^a
Tripsin	7.8	37		0.255±0.006 ^c		0.136±0.001 ^e
Kimotripsin	7.8	37		0.106±0.006 ^f		0.086±0.001 ^g
Alkalaz	8.0	50		0.154±0.003 ^e		0.233±0.002 ^d
Pepsin	2.1	37	d50h	0.338±0.001 ^b	dy50h	0.460±0.003 ^b
Tripsin	7.8	37		0.182±0.006 ^d		0.125±0.001 ^f
Kimotripsin	7.8	37		0.105±0.000 ^f		0.070±0.000 ^h
Alkalaz	8.0	50		0.243±0.003 ^c		0.345±0.002 ^c

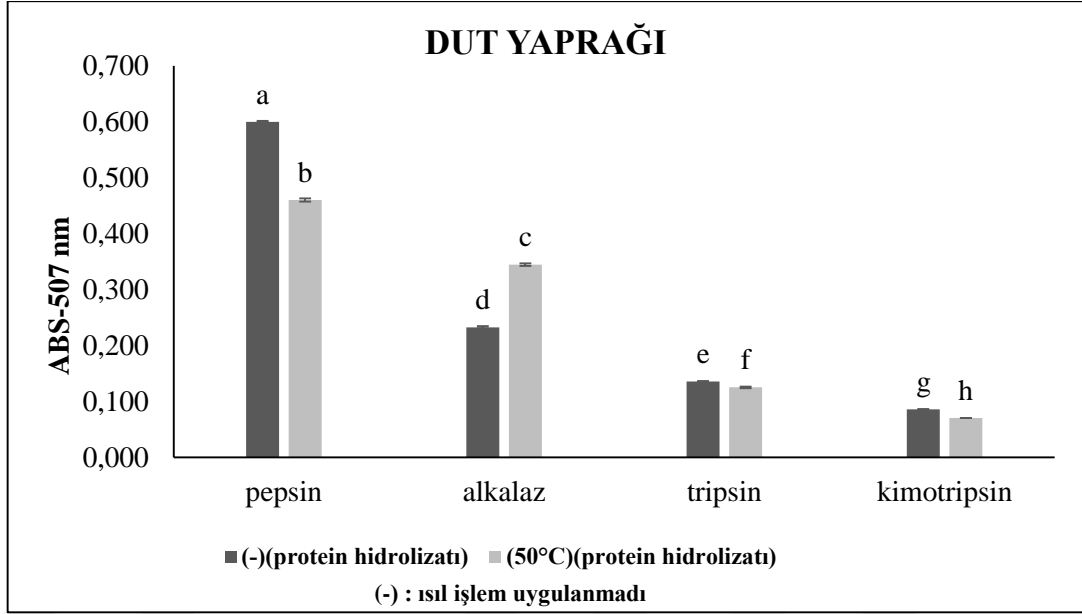
Sonuçlar; ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0.05$). Dut örneklerine ait isimlendirme; **dh**: ısıl işlem uygulanmayan örneğin protein hidrolizati, **d50h**: 50°C’ de ısıl işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati Dut yaprağı örneklerine ait isimlendirme; **Dyh**: ısıl işlem uygulanmayan örneğin protein hidrolizati, **dy50h**: 50°C’ de ısıl işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati

Farklı enzimlerle hidrolize edilen dut ekstraktlarının hidrolizasyon verimlerine ait Şekil 4.5 incelendiğinde ısı işlem uygulanmayan örneğin en yüksek oranda pepsin enzimiyle hidrolize olduğu ve en düşük kimotripsin enzimiyle hidrolize olduğu görülmektedir. 50°C’de ısı işlem uygulanan örneğin sonuçlarına bakıldığında ise diğer örneklerle benzer şekilde en yüksek oranda pepsin enzimiyle ve en düşük oranda kimotripsin enzimiyle hidrolize olduğu görülmektedir.



Şekil 4.5: Farklı Enzimlerle Hidrolize Edilen Dut Ekstraktlarının Hidrolizasyon Verimleri.

Dut yaprağı ekstraktlarının hidrolizasyon verimlerine ait Şekil 4.6 incelendiğinde ise dut örneğiyle benzer şekilde ısı işlem uygulanmayan örneğin en yüksek oranda pepsin enzimiyle ve en düşük kimotripsin enzimiyle hidrolize olduğu görülmektedir. 50°C’de ısı işlem uygulanan örneğin sonuçlarına bakıldığında ise diğer örneklerle benzer şekilde en yüksek oranda pepsin enzimiyle ve en düşük oranda kimotripsin enzimiyle hidrolize olduğu görülmektedir.



Şekil 4.6: Farklı Enzimlerle Hidrolize Edilen Dut Yaprığı Ekstraktlarının Hidrolizasyon Verimleri.

Pepsin, kimotripsin ve tripsin enzimleri genellikle insanlarda gıda proteinlerinin gastrointestinal bozulmasını simüle etmek için kullanılır. Yapılan birçok çalışmaya bakıldığında bitki protein hidrolizatlarının üretiminde pepsin kullanımının diğer enzimlerle kıyaslandığında daha yüksek ACE inhibisyon etkinliği gösterdiği bulunmuştur (Guang ve Phillips, 2009).

Bezelye proteinin ACE inhibisyon aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada mide fazını simüle etmek için kullanılan pepsin enziminin ACE inhibisyonunda en yüksek aktivite sağlayan enzim olduğu bulunmuştur (Vermeirssen vd., 2004).

Yapılan bir çalışmada spirulina yosunu 5 farklı enzimle (alkalaz, tripsin, floverzin, papain, pepsin) hidrolize edilerek peptitlerin ACE inhibisyon aktivitesi araştırılmıştır ve alkalaz enziminin en yüksek hidroliz derecesi (%20) verdiği bulunmuştur (Eroğlu, 2014).

Yumurta sarısı proteinine ait peptitlerin çeşitli biyolojik aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada peptitleri hidrolize etmek amacıyla pepsin enzimi kullanılmış ve elde edilen peptitlerden özellikle bazı fraksiyonların çok güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Zambrowicz vd., 2015).

Dut yaprağı proteinleri ve hidrolizatlarına gastro-intestinal sindirim simülasyonu uygulamasının antioksidan kapasiteye etkisinin araştırıldığı bir çalışmada dut yaprağı

proteinlerini hidrolize etmek amacıyla pepsin uygulamasının pankreatin uygulamasından daha iyi sonuçlar verdiği bulunmuştur (Sun vd., 2018).

Gastrointestinal sindirim sisteminde pepsin-pankreatin sindiriminin serbest aminoasit içeriğini ve toplam serbest aminoasit miktarını arttırdığı bildirilmiştir (Zhu vd., 2008).

Yapılan literatür taramasıyla kıyaslandığında; dut ve dut yaprağına ait hidrolizatların da benzer şekilde en yüksek oranda pepsin enzimiyle hidrolize oldukları görülmektedir.

Elde edilen veriler sonucunda en yüksek etkinliğe sahip olan pepsin enzimiyle, bütün protein ekstraktlarına hidroliz işleminin yapılmasına karar verilmiştir.

4.4.2. Pepsin hidrolizatlarının toplam serbest amino asit miktarlarının belirlenmesi

Proteinlerdeki toplam serbest amino asit miktarları, amino asitlerin fonksiyonel amino gruplarının kromofor bir madde (Cd-Ninhidrin) ile boyandıktan sonra belirlenmektedir (Wallece ve Fox, 1998). Dut ve dut yaprağı protein ekstraktları pepsin enzimiyle hidrolize edilmiş ve bulunan sonuçlar Çizelge 4.5’ te belirtilmiştir.

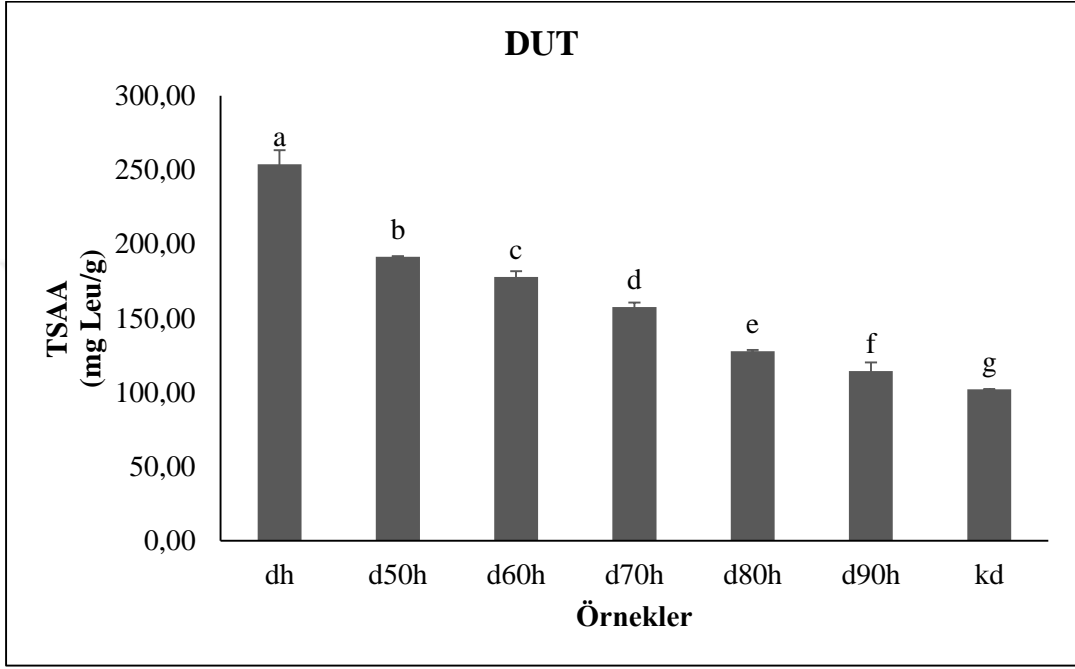
Çizelge 4.5: Pepsinle hidrolize edilen örneklerin toplam serbest amino asit miktarları.

Dut		Dut yaprağı	
Örnek	TSAA (mg Leu/g)	Örnek	TSAA (mg Leu/g)
kd	102.01±0.1 ^g	kdy	200.1±0.2 ^f
dh	253.83±9.573 ^a	dyh	352.9±0.870 ^a
d50h	191.37±0.435 ^b	dy50h	266.75±1.740 ^b
d60h	177.84±3.916 ^c	dy60h	240.91±1.740 ^c
d70h	157.53±3.046 ^d	dy70h	234.14±0.870 ^d
d80h	127.68±0.870 ^e	dy80h	218.76±1.740 ^e
d90h	114.45±5.657 ^f	dy90h	200.6±5.657 ^f

Sonuçlar; ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0.05$). Dut örneklerine ait isimlendirme; **dh**: ısıtma işlem uygulanmayan örneğin protein hidrolizati, **d50h**: 50°C’ de ısıtma işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d60h**: 60°C’ de ısıtma işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d70h**: 70°C’ de ısıtma işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d80h**: 80°C’ de ısıtma işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d90h**: 90°C’ de ısıtma işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **kd**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan). Dut yaprağı örneklerine ait isimlendirme; **dyh**: ısıtma işlem uygulanmayan örneğin protein hidrolizati, **dy50h**: 50°C’ de ısıtma işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **dy60h**: 60°C’ de ısıtma işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **dy70h**: 70°C’ de ısıtma işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati **dy80h**: 80°C’ de ısıtma işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati **dy90h**: 90°C’ de ısıtma işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **kdy**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan).

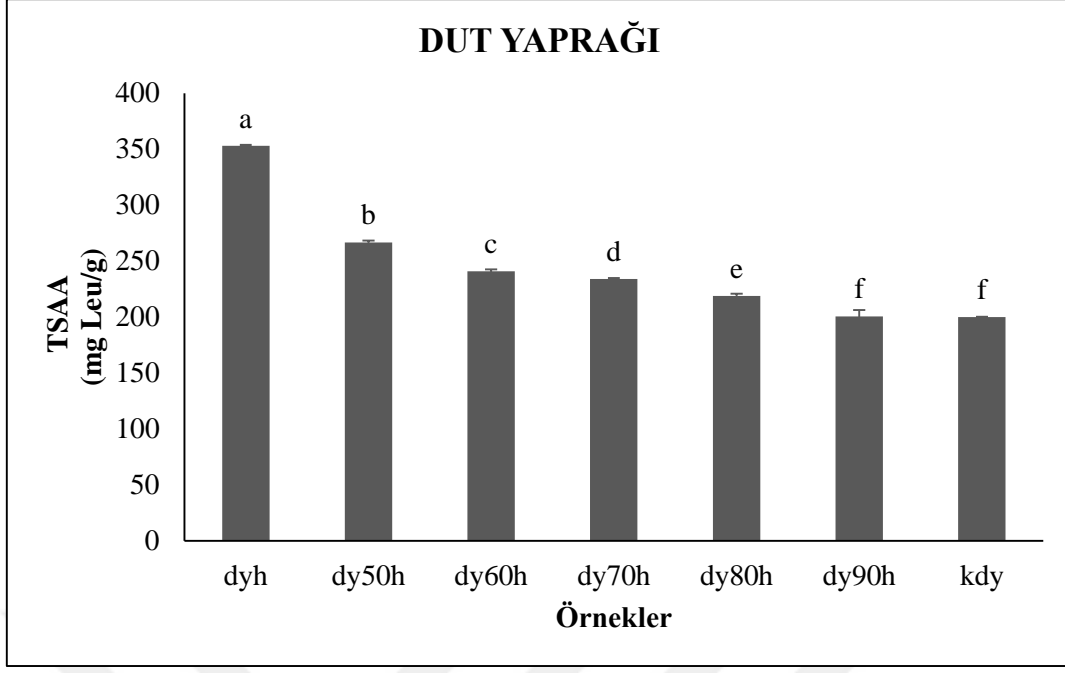
Dut protein ekstraktlarının pepsin enzimiyle muamelesi sonucu meydana gelen hidrolizatlara ait toplam serbest amino asit miktarlarını gösteren Şekil 4.7 incelendiğinde en

yüksek amino asit miktarının ısıl işlem uygulanmayan hidrolizata ait olduğu görülmektedir. Isıl işlem uygulanan örneklerle kıyaslandığında sıcaklık şiddeti arttıkça amino asit miktarının azaldığı; en yüksek 50°C’de ve en düşük 90°C’de ısıl işlem uygulanan örneğe ait olduğu görülmektedir. Hiçbir işlem uygulanmayan kuru dut örneği ile kıyaslandığında hidroliz işleminin bütün örneklerde toplam serbest amino asit miktarını istatistiksel derecede arttırdığı görülmektedir ($P<0.05$).



Şekil 4.7: Pepsinle hidrolize edilen dut örneklerinin toplam serbest amino asit miktarları.

Dut yaprağı örneklerine ait toplam serbest amino asit miktarlarını gösteren Şekil 4.8 incelendiğinde dut örnekleriyle benzer şekilde en yüksek amino asit miktarının ısıl işlem uygulanmayan hidrolizata ait olduğu görülmektedir. Isıl işlem uygulanan dut yaprağı örnekleri kendi aralarında kıyaslandığında sıcaklık şiddeti arttıkça amino asit miktarının azaldığı; en yüksek 50°C’de ve en düşük 90°C’de ısıl işlem uygulanan örneğe ait olduğu görülmektedir. Hiçbir işlem uygulanmayan kuru dut yaprağı örneği ile kıyaslandığında hidroliz işleminin bütün örneklerde toplam serbest amino asit miktarını istatistiksel derecede arttırdığı görülmektedir ($P<0.05$). Sadece 90°C’ de ısıl işlem gören örneğin serbest amino asit miktarı ile kuru dut yaprağı örneğinin sonuçlarının istatistiksel olarak benzer olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$).



Şekil 4.8: Pepsinle hidrolize edilen dut yaprağı örneklerinin toplam serbest amino asit miktarları.

Sığır serum albümini (BSA) üzerine tripsin ile hidroliz yapılmadan önce farklı derecelerde ısıl işlem ile muamele edilerek bu işlemin hidroliz ve peptit salınımı üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada protein çözeltilerinin 75 °C ve üzerinde ısıl işlemin hidroliz sürecini iyileştirdiği ve ısıl işlem uygulamasının, salınan peptitlerin sayısını ve miktarını arttırdığı bildirilmiştir (Arrutia vd., 2016). Bu çalışma ile benzer şekilde yapılan tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre kuru örneklerle kıyaslandığında dut ve dut yaprağı örneklerine 50 °C'de ısıl işlem uygulamasının hidroliz verimini arttırdığı görülmektedir.

Dut yaprağı proteinleri ve hidrolizatlarının antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada hidrolizatların toplam serbest aminoasit miktarları 820.10 ± 6.02 mg/g örnek olarak bulunmuştur (Sun vd., 2018). Bu sonuçlar ile kıyaslandığında yapılan tez çalışmasındaki dut yaprağı hidrolizatlarının amino asit miktarı daha düşük bulunmuştur. Bu durumun sebebi, Sun vd., (2018)' nin yaptığı çalışmada her bir amino asit içeriğinin ayrı ayrı tespit edildikten sonra toplam içerik hesaplanırken, yaptığımız tez çalışmasında lösin standardı kullanılarak amino asit içeriği bulunmuştur. Bu durumda hidrofobik-nonhidrofobik yapılar ve başka zincir dizilimleri sebebiyle amino asit içeriğinin daha düşük olabileceği düşünülmektedir.

4.5. ACE İnhibisyon Aktivitesi

4.5.1. Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının ACE inhibisyon aktivitesi

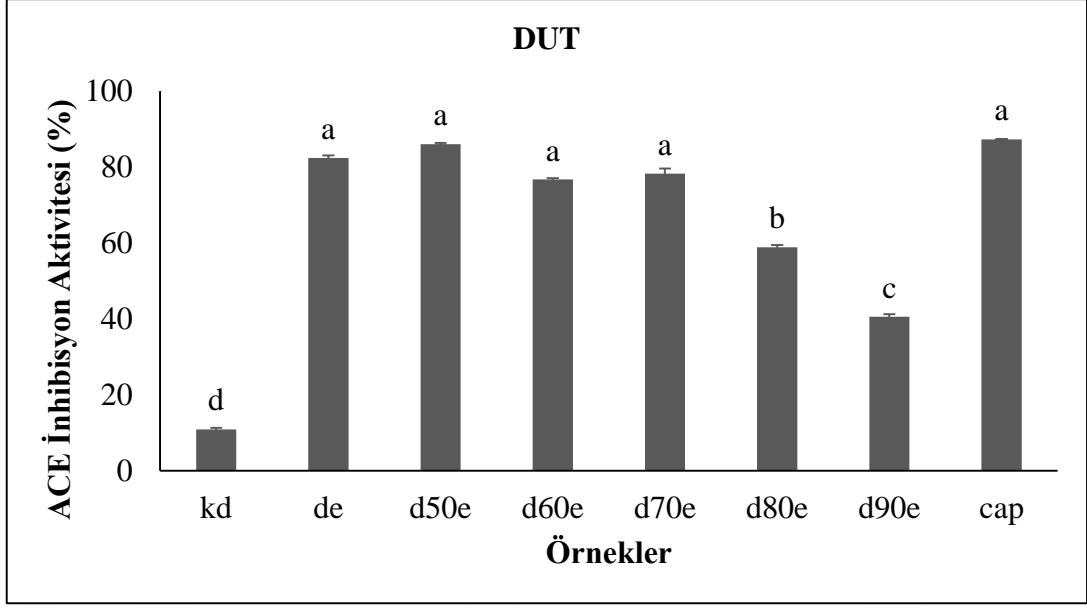
Dut ve dut yaprağı protein ekstraktları, ısıtma işlemi uygulanmayan kuru örnekler ve pozitif kontrol örneğine ait % ACE inhibisyon aktivitesi sonuçları Çizelge 4.6' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6: Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının % ACE inhibisyon değerleri.

Dut		Dut yaprağı	
Örnek	ACE inhibisyon aktivitesi (%)	Örnek	ACE inhibisyon aktivitesi (%)
kd	10.91±0.43 ^d	kdy	43.64±0.42 ^c
de	82.35±0.67 ^a	dye	66.06±0.39 ^b
d50e	86.00±0.36 ^a	dy50e	69.66±0.09 ^b
d60e	76.68±0.36 ^a	dy60e	62.82±0.88 ^b
d70e	78.26±1.34 ^a	dy70e	44.13±0.01 ^c
d80e	58.85±0.59 ^b	dy80e	32.93±0.66 ^d
d90e	40.53±0.67 ^c	dy90e	11.71±0.3 ^e
cap	87.28±0.02 ^a	cap	87.28±0.02 ^a

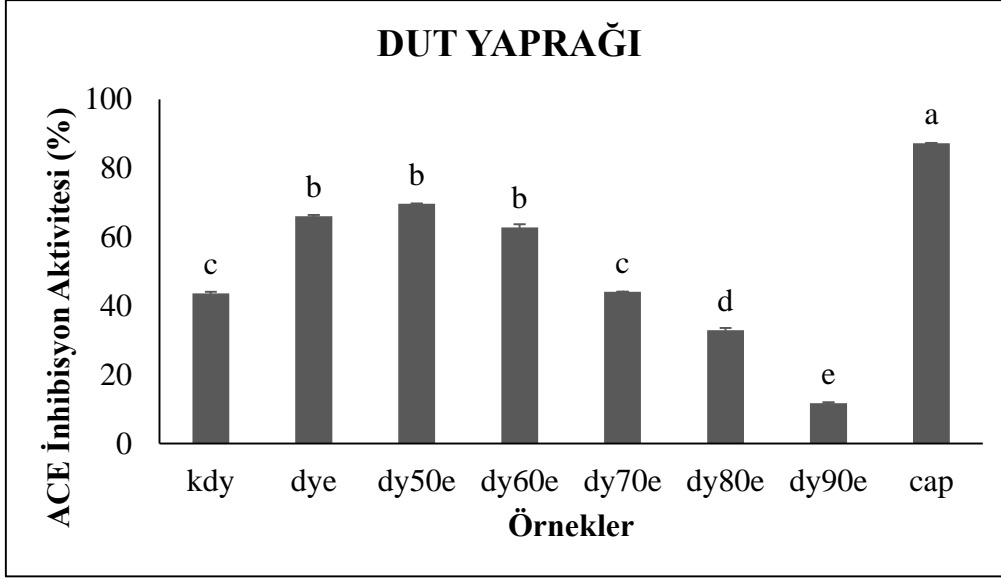
Sonuçlar; ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0.05$). Dut örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **de**: ısıtma işlemi uygulanmayan örneğin protein ekstraktı, **d50e**: 50°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı, **d60e**: 60°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı, **d70e**: 70°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **d80e**: 80°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **d90e**: 90°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **kd**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan) Dut yaprağı örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **dye**: ısıtma işlemi uygulanmayan örneğin protein ekstraktı, **dy50e**: 50°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı, **dy60e**: 60°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı, **dy70e**: 70°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **dy80e**: 80°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **dy90e**: 90°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **kdy**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan) Pozitif kontrol örneği **cap**: captopril olarak isimlendirilmiştir.

Dut protein ekstraktlarının % ACE inhibisyon aktivitesinin belirtildiği Şekil 4.9 incelendiğinde; üzerinde hiçbir işlem yapılmayan kuru dut örneğinin % ACE inhibisyon oranının (% 10.91±0.43) protein ekstraktlarına göre istatistiksel olarak düşük olduğu ve en yüksek ACE inhibisyon oranının dut örneklerinden 50°C ısıtma işlemi uygulanan protein ekstraktında (% 86.00±0.36) olduğu görülmektedir. Ayrıca captopril örneği (% 87.28±0.02) ile kıyaslandığında de, d50e, d60e, d70e örneklerinin %ACE inhibisyon değerlerinin istatistiksel olarak farklı olmadığı ve dolayısıyla antihipertansif özelliğinin yüksek olduğu görülmüştür. Dut örneklerine ısıtma işlemi uygulamasının % ACE inhibisyonu üzerinde istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($P<0.05$).



Şekil 4.9: Dut protein ekstraktlarının ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.

Protein ekstraksiyonu yapılan dut yaprağı örneklerinde en yüksek ACE inhibisyon oranının dye, dy50 ve dy60 örneklerinde olduğu ve dolayısıyla bu örneklerin antihipertansif özelliğinin yüksek olduğu görülmektedir. Sıcaklık arttıkça ACE inhibisyon etkisinin azaldığı ve 90°C’de ekstrakte edilen dut yaprağı örneğinin % ACE inhibisyon oranının (11.71 ± 0.3) diğer örneklerle göre istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak dut yaprağı örneklerine ısıl işlem uygulamasının % ACE inhibisyonu üzerinde istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($P < 0.05$).



Şekil 4.10: Dut yaprağı protein ekstraktlarının ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.

Yapılan bir çalışmada suyla ekstrakte edilen hardal (*Sinapis alba L.*) tanelerinin ekstraksiyon sıcaklığını 20°C'den 60°C'ye çıkarmanın ACE inhibisyon aktivitesini önemli düzeyde arttırdığı (%25-30) bulunmuştur (Yuk vd., 2000).

Wakame yosununun ACE inhibisyon etkisinin in vivo şartlarda araştırıldığı bir çalışmada proteinlerin ekstraksiyonunu sağlamak amacıyla 20 dakika boyunca sıcak su uygulaması yapılmış ve 10 peptid diziliminin en yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur (Suetsuna vd., 2004).

10 çeşit mantar türünde bulunan peptitlerin saflaştırılarak ACE inhibisyon aktivitesinin incelendiği bir çalışmada 100°C ve 25°C'de suyla ekstrakte edilen proteinlerden 25°C'de muamele gören mantarların daha yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur (Choi vd., 2001).

Yaptığım çalışmanın sonuçlarına bakılacak olursa literatürle benzerlik göstererek, düşük sıcaklıklarda ısıtılarak ekstrakte edilen dut ve dut yaprağı örneklerinin % ACE inhibisyon değerlerinin arttığı, ancak yüksek sıcaklıklarda ısıtılarak ekstrakte edilen örneklerin ise % ACE inhibisyon değerlerinin düştüğü belirlenmiştir ($P<0.05$).

4.5.2. Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının ACE inhibisyon aktivitesi

Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatları, ısıl işlem uygulanmayan kuru örnekler ve pozitif kontrol örneğine ait % ACE inhibisyon aktivitesi sonuçları Çizelge 4.7' de gösterilmiştir.

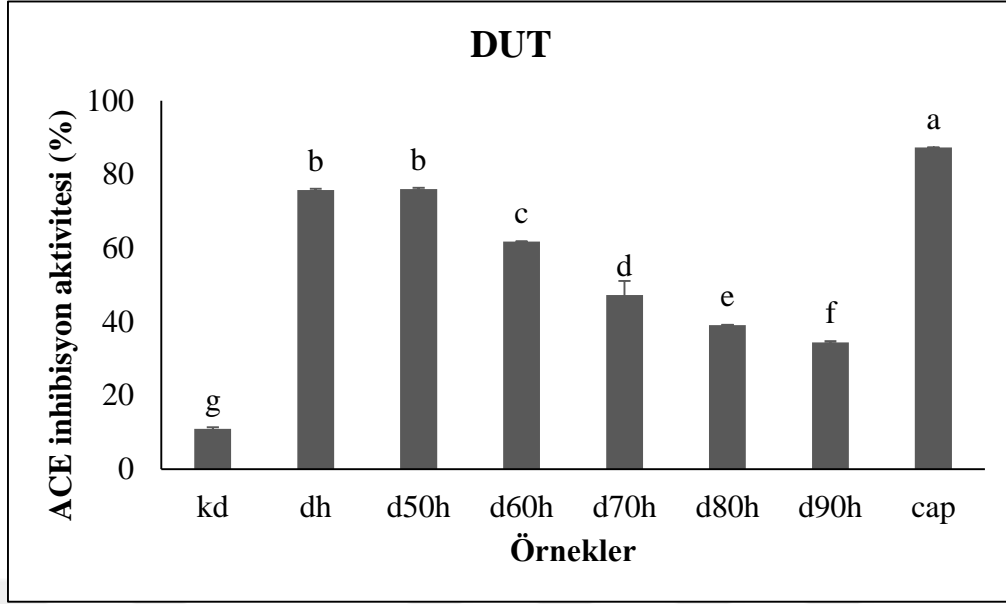
Çizelge 4.7: Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının % ACE inhibisyon değerleri.

Dut		Dut yaprağı	
Örnek	ACE inhibisyon aktivitesi (%)	Örnek	ACE inhibisyon aktivitesi (%)
kd	10.91±0.43 ^g	kdy	43.64±0.42 ^f
dh	75.79±0.33 ^b	dyh	85.24±0.21 ^a
d50h	76.02±0.32 ^b	dy50h	85.43±0.36 ^a
d60h	61.73±0.00 ^c	dy60h	69.31±0.21 ^b
d70h	47.27±3.76 ^d	dy70h	67.17±0.74 ^c
d80h	39.11±0.08 ^e	dy80h	69.53±0.03 ^d
d90h	34.41±0.32 ^f	dy90h	61.90±0.24 ^e
cap	87.28±0.02 ^a	cap	87.28±0.02 ^a

Sonuçlar; ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0.05$). Dut örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **dh**: ısıl işlem uygulanmayan örneğin protein hidrolizati, **d50h**: 50°C' de ısıl işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d60h**: 60°C' de ısıl işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d70h**: 70°C' de ısıl işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d80h**: 80°C' de ısıl işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d90h**: 90°C' de ısıl işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **kd**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan). Dut yaprağı örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **dyh**: ısıl işlem uygulanmayan örneğin protein hidrolizati, **dy50h**: 50°C' de ısıl işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **dy60h**: 60°C' de ısıl işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **dy70h**: 70°C' de ısıl işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **dy80h**: 80°C' de ısıl işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **dy90h**: 90°C' de ısıl işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **kdy**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan). Pozitif kontrol örneği **cap**: captopril olarak isimlendirilmiştir.

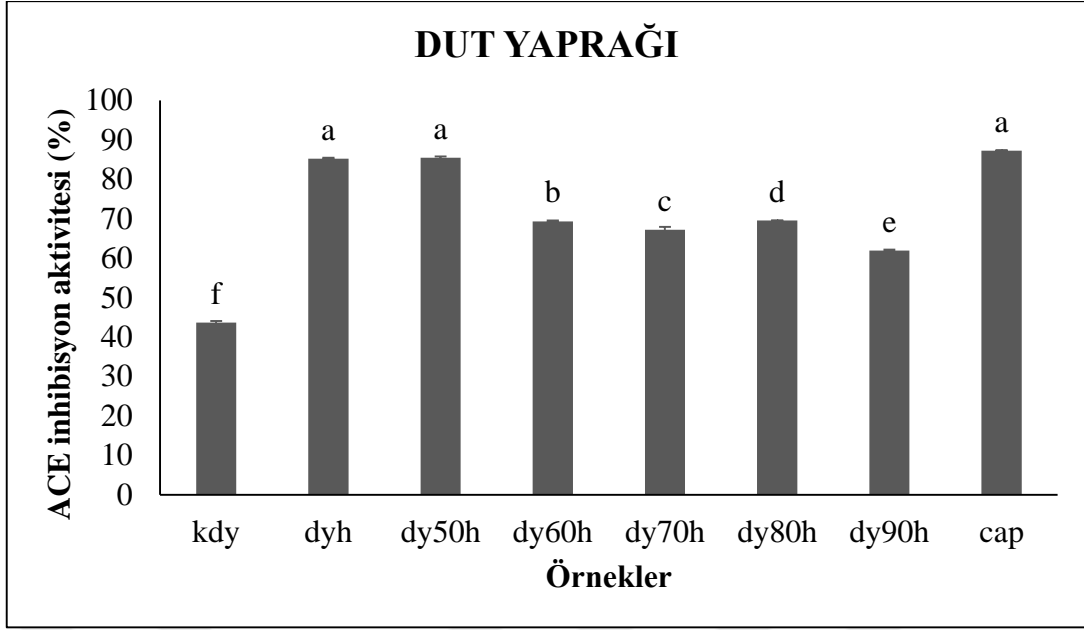
Dut protein hidrolizatlarının % ACE inhibisyon aktivitesinin belirtildiği Şekil 4.11 incelendiğinde; üzerinde hiçbir işlem yapılmayan kuru dut örneğinin % ACE inhibisyon oranının (% 10.91±0.43) protein hidrolizatlarına göre istatistiksel olarak düşük olduğu görülmektedir. Protein hidrolizasyonu yapılan dut örneklerine bakıldığında en yüksek ACE inhibisyon oranının dh ve dh50 örneklerinde (% 75.79±0.33 ve 76.02±0.32) olduğu ve bu örneklerin antihipertansif özelliğinin yüksek olduğu görülmektedir. Sıcaklık arttıkça ACE inhibisyon etkisinin azaldığı ve 90°C' de hidrolize edilen dut örneğinin % ACE inhibisyon oranının (% 34.41±0.32) diğer örneklere göre istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur.

Üzerinde hiçbir işlem uygulanmayan kuru dut örneği ile kıyaslandığında dut hidrolizatlarına ısıl işlem uygulamasının % ACE inhibisyonu üzerinde istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($P<0.05$).



Şekil 4.11: Dut protein hidrolizatlarının % ACE inhibisyon aktivitesi.

Dut yaprağı protein hidrolizatlarının ACE inhibisyon aktivitesinin belirtildiği Şekil 4.12 incelendiğinde; üzerinde hiçbir işlem yapılmayan kuru dut yaprağı örneğinin % ACE inhibisyon oranının (% 43.64±0.42) protein hidrolizatlarına göre istatistiksel olarak düşük olduğu görülmektedir. Protein hidrolizasyonu yapılan dut yaprağı örneklerine bakıldığında en yüksek ACE inhibisyon oranının dyh (% 85.24±0.21) ve dy50h (% 85.43±0.36) örneklerinde olduğu ve pozitif kontrol örneği olan captopril (% 87.28±0.02) ile kıyaslandığında sonuçlar arasında istatistiksel olarak farklılık olmadığı dolayısıyla antihipertansif özelliğinin yüksek olduğu görülmektedir. Sıcaklık arttıkça ACE inhibisyon etkisinin azaldığı ve 90°C’de hidrolize edilen dut yaprağı örneğinin % ACE inhibisyon oranının (% 61.90±0.24) diğer örneklere göre istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur. Hiçbir işlem uygulanmayan kuru örnek ile kıyaslandığında dut yaprağı hidrolizatlarına ısıl işlem uygulamasının % ACE inhibisyonu üzerinde istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($P<0.05$).



Şekil 4.12: Dut yaprağı protein hidrolizatlarının % ACE inhibisyon aktivitesi.

Deve sütünün *Lactobacillus helveticus* ile fermentasyonu sonucu ACE inhibisyon aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada 100 °C’de 20 dakika boyunca ısıl işlem uygulamasının inhibisyon aktivitesinde kayıp oluşturmadığı ancak 110 °C’de 60 dakika boyunca uygulanan ısıl işlem sonrasında % 50 oranında aktivite kaybı olduğu tespit edilmiştir (Quan vd., 2008).

Peynir altı suyu protein hidrolizatlarına uygulanan ısıl işlem ve enzimatik hidroliz işlemlerinin antihipertansif aktivite üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 65 °C’de ısıl işlem görmüş izolatların ACE inhibitörü aktivitesinin 95 °C’de ısıtma ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Da Costa vd., 2007).

Literatürle benzer şekilde dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarına ısıl işlem uygulamasının ACE inhibisyon aktivitesi üzerinde istatistiksel olarak etkisinin olduğu ancak yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça aktivitenin azaldığı görülmektedir. Aktivitedeki bu farklılığın sebebi protein izolatlarındaki yapısal değişikliklerin indüklenmesiyle açıklanabilir. Sıcaklık 50 °C ve civarında iken protein yapısında bulunan hidrofobik kümelerin varlığıyla karakterize edilen yapılardaki katlanmalar açılır ve proteinlerin hidrolizi sırasında enzimlerin bu bölgelere ulaşarak aktivite göstermesine olanak tanır. Ancak sıcaklık 90 °C ve civarına ulaştığında yüksek molekül ağırlıklı, çözünmez yapılar oluşur ve bu durum biyoaktivitede kayıplara sebep olur (Hirose, 1993 ; La Fuente vd., 2002).

4.5.3. Dut ve dut yaprağı protein fraksiyonlarının (MA < 10 kDa ve MA < 3kDa) ACE inhibisyon aktivitesi

Enzimatik hidrolizden elde edilen protein hidrolizatlarına 10 kDa ve 3 kDa membran filtreleri kullanılarak farklı molekül büyüklüğünde fraksiyonlar elde edilmiştir.

4.5.3.1. 10 kDa altı fraksiyonların (MA < 10kDa) ACE inhibisyon aktivitesi

Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının 10 kDa'dan küçük fraksiyonlarını elde edebilmek için ultrafiltrasyon tekniği kullanılmış ve örneklerin % ACE inhibisyon aktivite değerleri Çizelge 4.8'de belirtilmiştir.

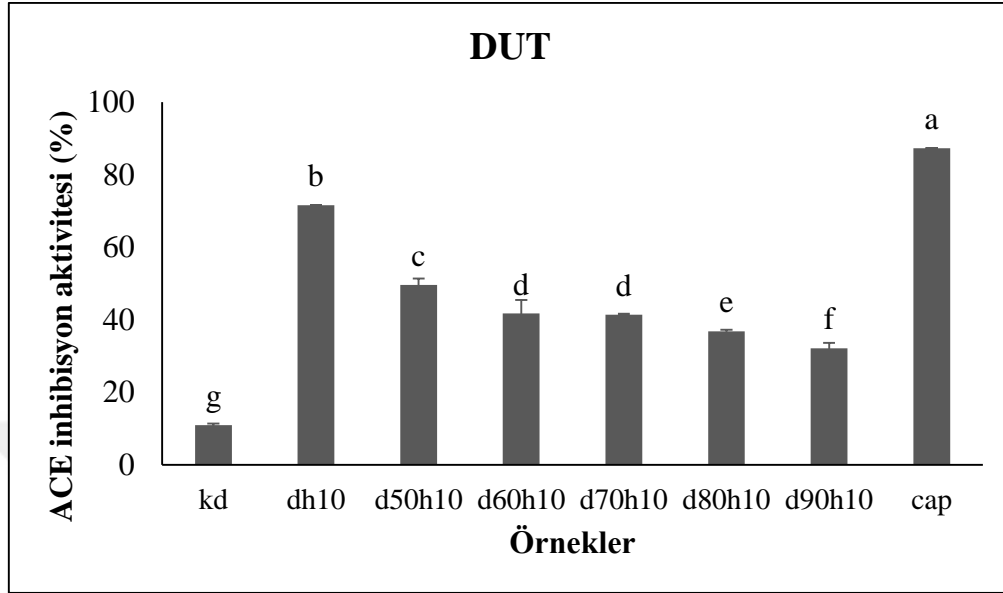
Çizelge 4.8: MA <10 kDa olan dut ve dut yaprağı protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon değerleri.

Dut		Dut yaprağı	
Örnek	ACE inhibisyon aktivitesi (%)	Örnek	ACE inhibisyon aktivitesi (%)
kd	10.91±0.43 ^g	kdy	43.64±0.42 ^c
dh10	71.55±0.05 ^b	dyh10	82.43±0.65 ^{ab}
d50h10	49.63±1.71 ^c	dy50h10	77.6±0.87 ^{ab}
d60h10	41.72±3.73 ^d	dy60h10	71.59±2.61 ^{ab}
d70h10	41.42±0.27 ^d	dy70h10	69.00±0.37 ^b
d80h10	36.77±0.43 ^e	dy80h10	71.75±0.41 ^{ab}
d90h10	32.12±1.52 ^f	dy90h10	54.14±1.80 ^c
cap	87.28±0.02 ^a	cap	87.28±0.02 ^a

Sonuçlar; ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0.05$). Dut örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **dh10**: ısıtma işlemi uygulanmayan örneğin MA<10kDa fraksiyonu, **d50h10**: 50°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin MA<10kDa fraksiyonu, **d60h10**: 60°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin MA<10kDa fraksiyonu, **d70h10**: 70°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin MA<10kDa fraksiyonu, **d80h10**: 80°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin MA<10kDa fraksiyonu, **d90h10**: 90°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin MA<10kDa fraksiyonu, **kd**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan). Dut yaprağı örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **dyh10**: ısıtma işlemi uygulanmayan örneğin MA<10kDa fraksiyonu, **dy50h10**: 50°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin MA<10kDa fraksiyonu, **dy60h10**: 60°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin MA<10kDa fraksiyonu, **dy70h10**: 70°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin MA<10kDa fraksiyonu, **dy80h10**: 80°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin MA<10kDa fraksiyonu, **dy90h10**: 90°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin MA<10kDa fraksiyonu, **kdy**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan). Pozitif kontrol örneği **cap**: captopril olarak isimlendirilmiştir.

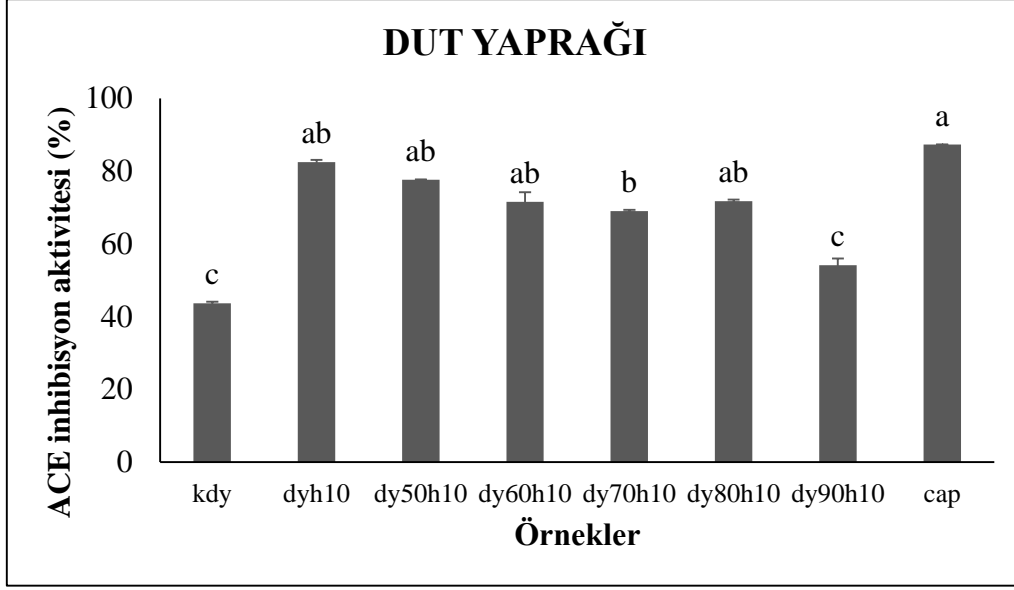
Molekül ağırlığı 10 kDa'dan küçük dut protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesinin belirtildiği Şekil 4.13 incelendiğinde; üzerinde hiçbir işlem yapılmayan kuru dut örneğinin % ACE inhibisyon oranının diğer örneklerle göre istatistiksel olarak düşük olduğu görülmektedir. Fraksiyonlarına ayrılan dut örneklerine bakıldığında en yüksek ACE inhibisyon oranının dh10 örneğinde olduğu görülmektedir. Sıcaklık uygulanan örnekler arasında sıcaklık arttıkça ACE inhibisyon etkisinin azaldığı ve 90°C'de hidrolize edilen dut

örneğin % ACE inhibisyon oranının diğer örneklere göre istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur ($P<0.05$).



Şekil 4.13: MA <10kDa olan dut protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesi.

Molekül ağırlığı 10 kDa'dan küçük olan dut yaprağı protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesinin belirtildiği Şekil 4.14 incelendiğinde ise; üzerinde hiçbir işlem yapılmayan kuru dut yaprağı örneğinin % ACE inhibisyon oranının fraksiyonlarına ayrılan örneklere göre istatistiksel olarak düşük olduğu, sadece 90°C' de ısıl işlem görmüş örneğin fraksiyonuyla benzer sonuçlar içerdiği görülmektedir. Fraksiyonlarına ayrılan dut yaprağı örneklerine bakıldığında dyh10, dy50h10, dy60h10, dy70h10, dy80h10 örneklerinin ACE inhibisyon oranlarının istatistiksel olarak benzer olduğu ve pozitif kontrol örneği olan captopril ile kıyaslandığında sonuçlar arasında istatistiksel olarak farklılık olmadığı dolayısıyla antihipertansif özelliğinin yüksek olduğu görülmektedir. Sıcaklık arttıkça ACE inhibisyon etkisinin değişmediği, ancak 90°C'de ısıl işlem gören dut yaprağı örneğinin % ACE inhibisyon oranının diğer örneklere göre istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur ($P<0.05$).



Şekil 4.14: MA <10kDa olan dut yaprağı protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesi.

4.5.3.2. 3kDa altı fraksiyonların (MA <3 kDa) ACE inhibisyon aktivitesi

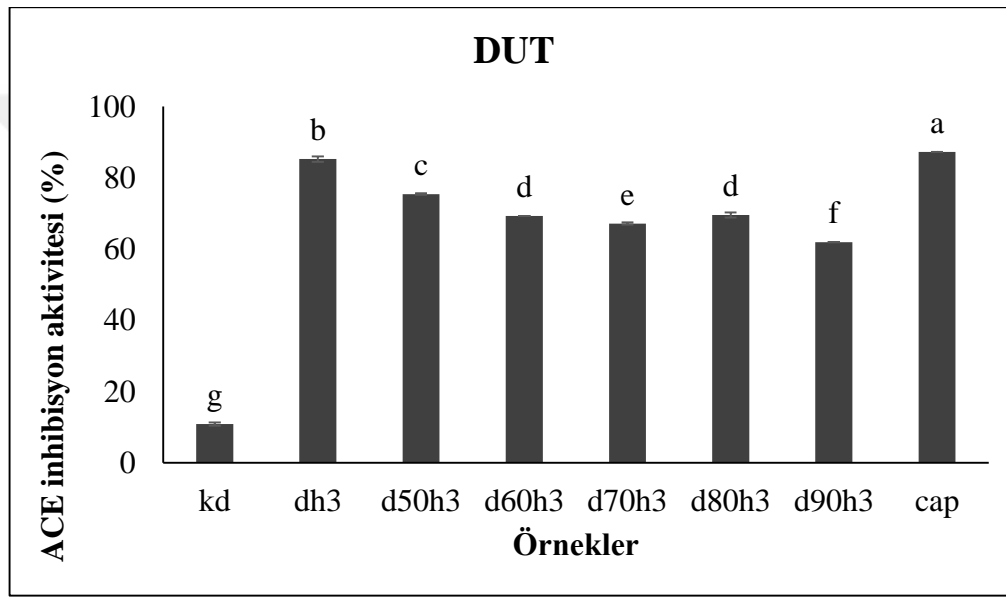
Pepsinle hidrolize edilen dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının 3 kDa membran kullanılarak fraksiyonlarına ayrılması sonucu elde edilen % ACE inhibisyon değerleri Çizelge 4.9’da belirtilmiştir.

Çizelge 4.9: MA <3 kDa olan dut ve dut yaprağı protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon değerleri.

Dut		Dut Yaprığı	
Örnek	ACE inhibisyon aktivitesi (%)	Örnek	ACE inhibisyon aktivitesi (%)
kd	10.91±0.43 ^g	kdy	43.64±0.42 ^f
dh3	85.24±0.77 ^b	dyh3	78.74±0.29 ^{bc}
d50h3	75.43±0.21 ^c	dy50h3	76.28±0.23 ^c
d60h3	69.31±0.00 ^d	dy60h3	79.48±0.22 ^b
d70h3	67.17±0.28 ^e	dy70h3	77.63±0.11 ^{bc}
d80h3	69.53±0.70 ^d	dy80h3	72.81±2.78 ^d
d90h3	61.90±0.00 ^f	dy90h3	66.58±0.86 ^e
cap	87.28±0.02 ^a	cap	87.28±0.02 ^a

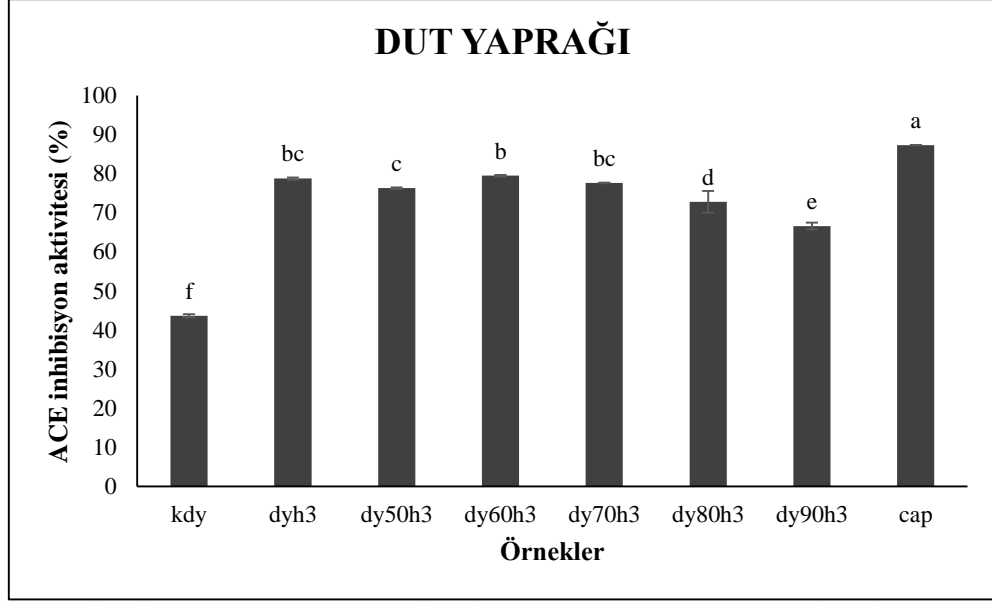
Sonuçlar; ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0.05$). Dut örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **dh3**: ısıt işlem uygulanmayan örneğin MA<3kDa fraksiyonu, **d50h3**: 50°C’ de ısıt işlem uygulanan örneğin MA<3kDa fraksiyonu, **d60h3**: 60°C’ de ısıt işlem uygulanan örneğin MA<3kDa fraksiyonu, **d70h3**: 70°C’ de ısıt işlem uygulanan örneğin MA<3kDa fraksiyonu, **d80h3**: 80°C’ de ısıt işlem uygulanan örneğin MA<3kDa fraksiyonu, **d90h3**: 90°C’ de ısıt işlem uygulanan örneğin MA<3kDa fraksiyonu, **kd**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan). Dut yaprağı örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **dyh3**: ısıt işlem uygulanmayan örneğin MA<3kDa fraksiyonu, **dy50h3**: 50°C’ de ısıt işlem uygulanan örneğin MA<3kDa fraksiyonu, **dy60h3**: 60°C’ de ısıt işlem uygulanan örneğin MA<3kDa fraksiyonu, **dy70h3**: 70°C’ de ısıt işlem uygulanan örneğin MA<3kDa fraksiyonu, **dy80h3**: 80°C’ de ısıt işlem uygulanan örneğin MA<3kDa fraksiyonu, **dy90h3**: 90°C’ de ısıt işlem uygulanan örneğin MA<3kDa fraksiyonu, **kdy**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan). Pozitif kontrol örneği **cap**: captopril olarak isimlendirilmiştir.

Molekül ağırlığı 3 kDa'dan küçük olan dut protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesinin gösterildiği Şekil 4.15 incelendiğinde; üzerinde hiçbir işlem yapılmayan kuru dut örneğinin % ACE inhibisyon oranının diğer örneklerle kıyaslandığında istatistiksel olarak çok düşük olduğu görülmektedir. Fraksiyonlarına ayrılan dut örneklerine bakıldığında en yüksek ACE inhibisyon oranının dh3 örneğinde olduğu görülmektedir. Sıcaklık arttıkça ACE inhibisyon etkisinin azaldığı ve 90°C'de hidrolize edilen dut örneğinin % ACE inhibisyon oranının diğer örneklere göre istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur ($P<0.05$).



Şekil 4.15: MA <3kDa olan dut protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesi.

Molekül ağırlığı 3 kDa'dan küçük olan dut yaprağı protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesinin gösterildiği Şekil 4.16 incelendiğinde ise; üzerinde hiçbir işlem yapılmayan kuru dut yaprağı örneğinin % ACE inhibisyon oranının fraksiyonlarına ayrılan örneklere göre istatistiksel olarak düşük olduğu görülmektedir. Fraksiyonlarına ayrılan dut yaprağı örneklerine bakıldığında 70°C'ye kadar ısı işlem uygulanan örneklerin ACE inhibisyon oranlarının istatistiksel olarak benzer olduğu ve antihipertansif özelliğinin yüksek olduğu görülmektedir. Sıcaklık arttıkça ACE inhibisyon etkisinin ciddi oranda değişmediği, ancak 80°C ve 90°C'de ısı işlem gören dut yaprağı örneklerinin % ACE inhibisyon oranlarının diğer örneklere göre istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur ($P<0.05$).



Şekil 4.16: MA <3kDa olan dut yaprağı protein fraksiyonlarının % ACE inhibisyon aktivitesi.

Yabani badem proteinlerinde ACE inhibitörü peptitleri tanımlamak için yapılan bir çalışmada 3 kDa' dan küçük fraksiyonlarda ACE-inhibitörü aktivitesi test edilen diğer fraksiyonlardan daha yüksek bulunmuştur (%86.9) (Mirzapour vd., 2017).

Kayısı çekirdeği hidrolizatlarında ACE inhibisyon özelliklerinin incelendiği bir çalışmada 1 kDa'dan küçük fraksiyonlardan elde edilen ACE-inhibitörü aktivitesinin diğer fraksiyonlardan daha yüksek olduğu bulunmuştur (IC₅₀:0.14 mg/mL) (Wang vd,2011).

Sığır kazeini hidrolizatlarının pepsinle hidrolize edildiği başka bir çalışmada ise molekül ağırlığı 3 kDa'dan küçük olan hidrolizatların diğer hidrolizatlara göre 10 kat daha fazla ACE inhibisyon aktivitesi gösterdiği bulunmuştur (Miguel et al.,2009).

Dut örneklerinin fraksiyonlarına bakıldığında 3 kDa altı hidrolizatların % ACE inhibisyon değerlerinin 10 kDa altı hidrolizatlarına oranı (dh3/dh10, d50h3/d50h10, d60h3/d60h10, d70h3/d70h10, d80h3/d80h10, d90h3/d90h10) ortalama 1.6 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla literatürle benzer bir şekilde dut örneğinde kısa zincirli peptitlerin etkinliğinin uzun zincirliilere göre daha fazla olduğu görülmektedir.

Küçük molekül ağırlıklı fraksiyonların daha yüksek ACE inhibisyon aktivitesi gösterdiği bilinse de tam tersini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Guang ve Phillips, 2009).

Soya proteinleriyle yapılan bir çalışmada 10 kDa ve 5 kDa fraksiyonlarıyla elde edilen ACE inhibisyon aktivite sonuçları incelendiğinde istatistiksel olarak bir farklılık olmadığı bulunmuştur (Wu ve Ding, 2002).

Dut yaprağı örneklerine bakıldığında ise 3 kDa altı hidrolizatların % ACE inhibisyon değerlerinin 10 kDa altı hidrolizatlara oranının ortalama 1.07 olduğu görülmektedir. Dolayısıyla aktivite gösteren kısa zincirli peptit sayısı ile uzun zincirli peptit sayısı benzer bulunmuştur.

Yapılan birçok çalışmada ACE inhibitör etkisinin hidroliz derecesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Pihlanto vd., 2010).

ACE inhibisyon aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada kırmızı ve yeşil mercimek örneklerinin hidroliz işlemi öncesinde aktivite göstermediği ancak farklı enzimlerle hidrolize edildikten sonra aktivitenin istatistiksel olarak arttığı belirtilmiştir (Barbana ve Boye, 2011).

% ACE inhibisyon analizi yapılan bütün dut yaprağı örneklerinin beraber değerlendirildiği Şekil 4.18 incelendiğinde; dut yaprağı ekstraktları ve hidrolizatları birbirleriyle kıyaslandığı durumda hidrolizatların ACE inhibisyon aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

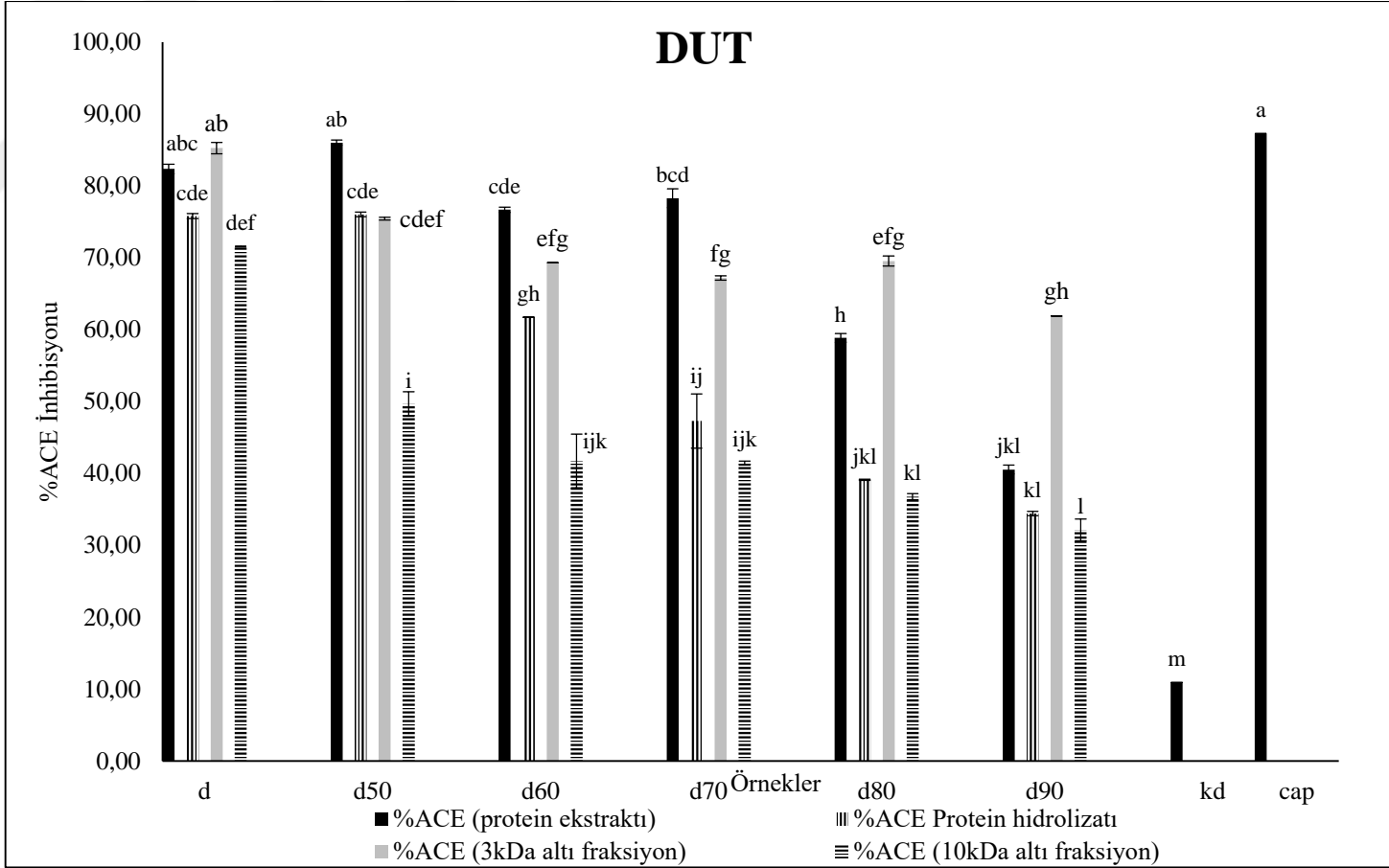
ACE inhibitörü peptitlerin in vitro aktivitelerinin bilinmesine rağmen bazı çalışmalarda oral alımdan sonra antihipertansif aktivitede başarısız olduğu belirtilmiştir. Tavuk kasının ACE inhibisyon etkisinin araştırıldığı bir çalışmada proteinlerin thermolysinle sindirilerek açığa çıkarılan Phe-Lys-Gly-Arg-Tyr-Tyr-Pro peptidinin in vitro olarak etkinlik gösterdiği (IC₅₀ değeri: 0.55 µM), ancak oral alımda (60 mg/kg BW) aktivite göstermediği belirtilmiştir (Iroyukifujita vd., 2010).

İn vitro ACE inhibitör aktivitesi ile in vivo antihipertansif aktivite arasındaki bu önemli korelasyon eksikliği, ACE inhibitör peptitlerin biyoyararlanım/kullanılabilirliği veya bu peptitlerden etkilenen ACE inhibisyonu dışındaki olası antihipertansif mekanizmalar ile açıklanabilir (Vercruyssen vd., 2009).

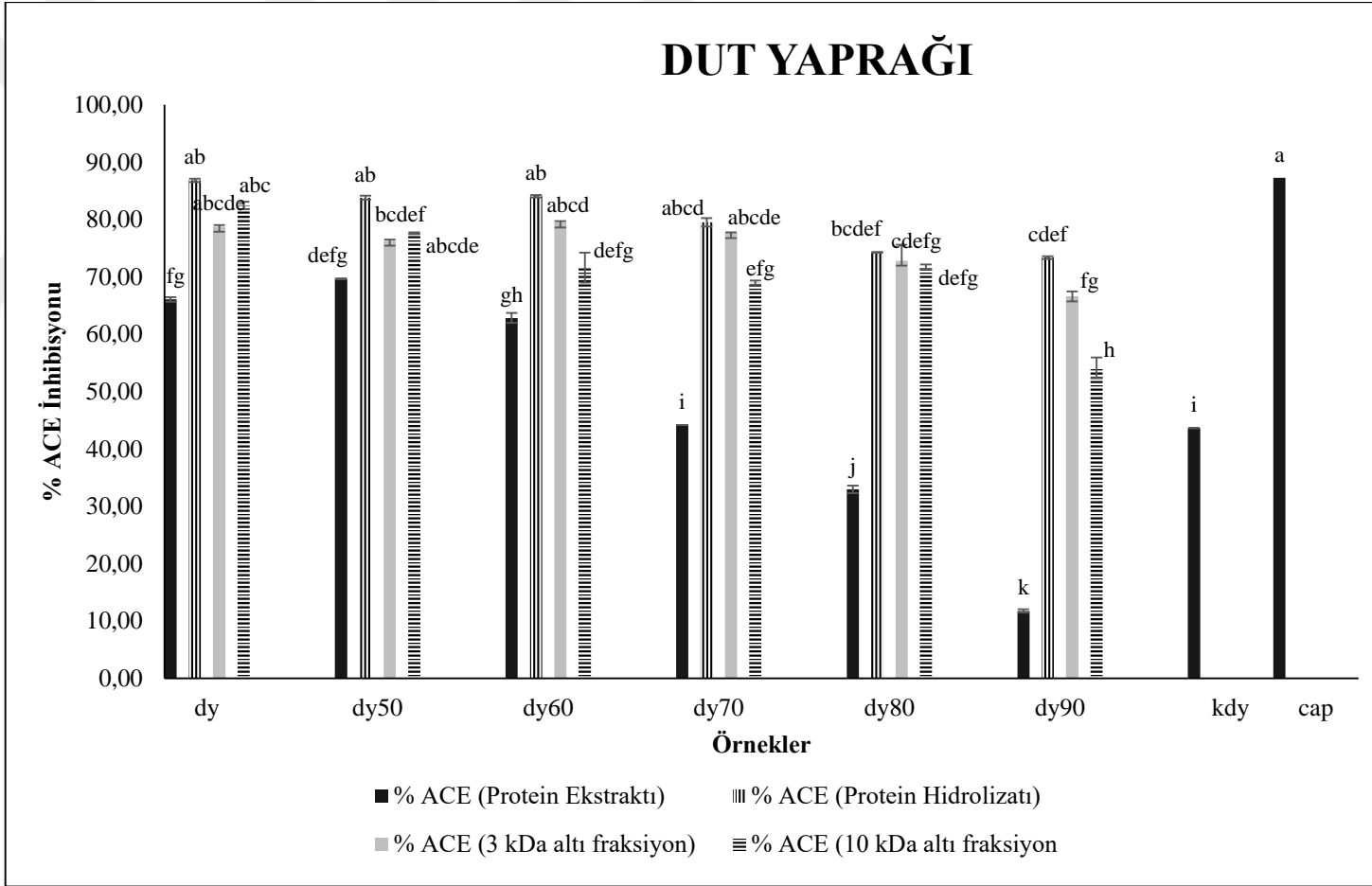
Yaptığımız çalışmada hayvan denemesi yapılmadığı için örneklerin hidrolize edilmeden saf haliyle yapılan analizlerinde bu duruma benzer sonuçlar bulunmuştur. Hiçbir

işlem uygulanmayan dut ve dut yaprağı örneklerinin ACE inhibisyon aktivite değerleriyle (kd: % 10.91±0.43 ve kdy: % 43.64±0.42) kıyaslandığında hidrolizatların etkililiğinin (dh: % 75.79±0.33 ve dyh: 85.24±0.21) istatistiksel derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($P<0.05$).





Şekil 4.17: % ACE inhibisyon analizi yapılan bütün dut örneklerinin beraber değerlendirilmesi.



Şekil 4.18: % ACE inhibisyon analizi yapılan bütün dut yaprağı örneklerinin beraber değerlendirilmesi.

4.5.4. IC₅₀ değerinin belirlenmesi

Literatürde yapılan çalışmalara bakılacak olursa ACE inhibitörü maddelerin etkinlikleri kıyaslanırken IC₅₀ değerleri kullanılmaktadır.

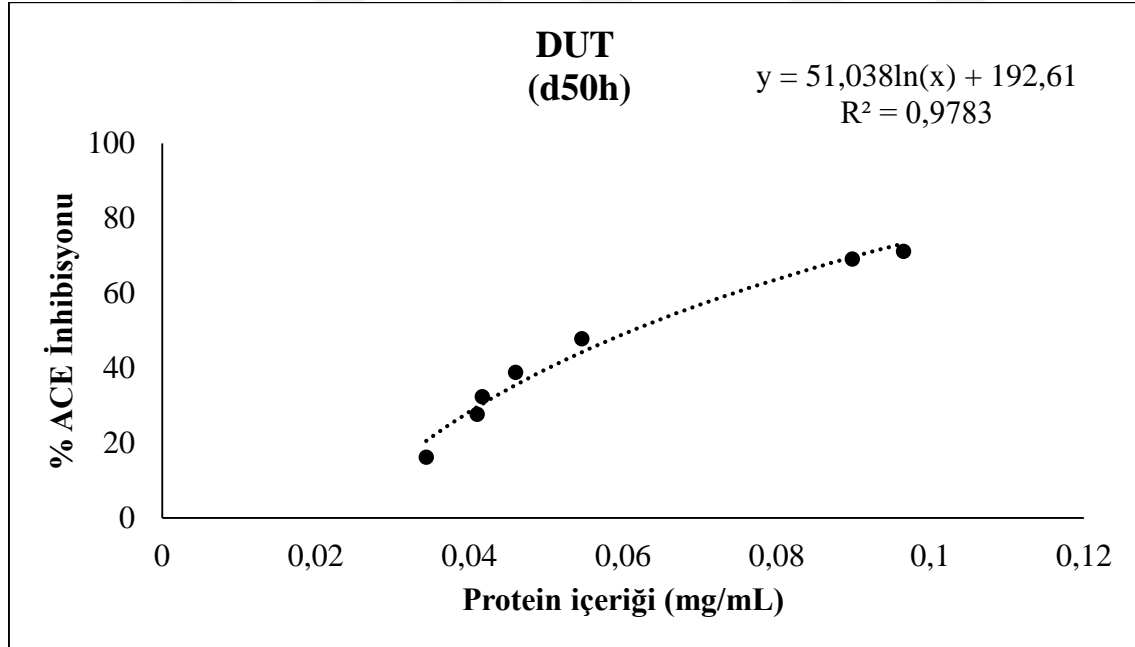
Dut ve dut yaprağı hidrolizatlarının IC₅₀ değerlerini belirleyebilmek amacıyla % ACE inhibisyon aktivitesi en yüksek örnekler (d50h ve dy50h) kullanılmış ve örnekler farklı oranlarda seyreltilerek (1/5 – 1/10 – 1/25 – 1/50 – 1/75 – 1/100 – 1/125)(mg örnek/ mL su) ACE inhibisyon aktiviteleri ve protein değerleri ölçülmüştür.

4.5.4.1. Dut örneğinin (d50h) IC₅₀ değerinin belirlenmesi

Dut örneklerinden d50h örneğine ait protein konsantrasyonuna karşılık % ACE inhibisyon aktivitesini ifade eden grafik Şekil 4.19' da gösterilmiştir.

Grafığe ait elde edilen denkleme (Denklem 4.1) göre dut örneği için ACE'nin %50'sini inhibe edebilecek protein konsantrasyonunun 0.061 mg/mL olduğu bulunmuştur.

% ACE inhibisyon aktivitesi = 51.038ln(x) (protein konsantrasyonu) + 192.61 (Denklem 4.1)



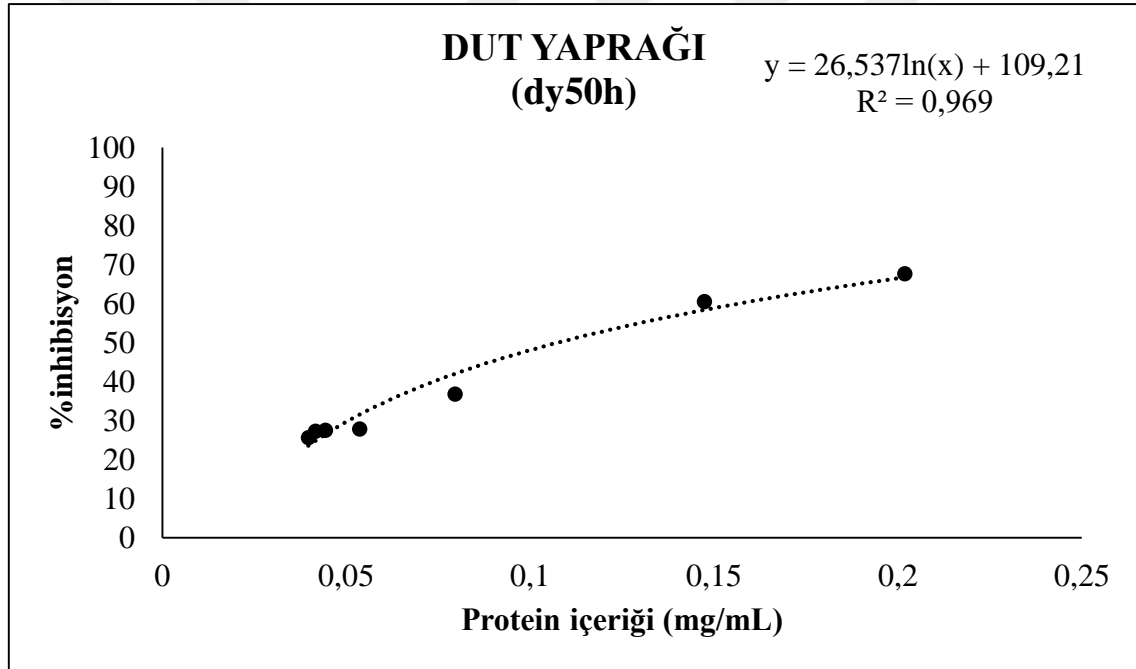
Şekil 4.19: Dut örneğinin (d50h) IC₅₀ değerinin belirlenmesine ait grafik.

4.5.4.2. Dut yaprağı örneğinin (dy50h) IC₅₀ değerinin belirlenmesi

Dut yaprağı örneğine bakıldığında yapılan işlemler sonucunda protein konsantrasyonuna bağlı % ACE inhibisyon aktivitesini gösteren denklem (Denklem 4.2) aşağıdaki gibi bulunmuştur.

$$\% \text{ ACE inhibisyon aktivitesi} = 26.537 \ln x (\text{protein konsantrasyonu}) + 109.21 \quad (\text{Denklem 4.2})$$

Elde edilen denkleme göre dut yaprağı örneği için ACE'nin %50'sini inhibe edebilecek protein konsantrasyonunun 0.107 mg/mL olduğu bulunmuştur (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: Dut yaprağı örneğinin (dy50h) IC₅₀ değerinin belirlenmesine ait grafik.

Dut (*Morus spp.*) yaprağı ekstraktlarının damar genişletici (vasodilatör) etkisinin araştırıldığı bir çalışmada anjiotensin I-indükleme konsantrasyonunun (EC₅₀) 25 µg/mL olduğu ve bu değer captopril ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Pothinuch vd., 2017).

Gammaaminobütirik asit (GABA) içeren suyla ekstrakte edilmiş dut yapraklarıyla yapılan bir çalışmada ratlar üzerinde antihipertansif etki araştırılmış ve ACE-inhibisyon aktivitesi (IC₅₀) 29.8 mg/mL değerinde bulunmuştur. Ayrıca makalenin hipotezi, dut yaprağında antihipertansif etkinin tamamının GABA'dan kaynaklandığına yönelik

kurulmuştur ve eğer böyleyse sadece GABA verilen ratlarla sadece dut yaprağı verilen (ikisi de aynı oranda GABA içeriyor) ratlarda aynı oranda antihipertansif etkinin olması bekleniyor ancak sonuç olarak yüksek doz dut yaprağı ekstraktı verilen ratlarda aynı doz saf GABA verilene göre antihipertansif etkinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Böylece dut yaprağında antihipertansif etkinin GABA'dan başka mekanizmalarla da açıklanabileceği belirtilmiştir (Yang vd., 2012). Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre ACE-inhibitörü peptitlerin antihipertansif etkiyi açıklamada daha etkili olabileceği düşünülmektedir. Skate (Raja Kenojei) bitkisinin farklı enzimlerle hidrolizasyona tabi tutularak ACE inhibisyonunun araştırıldığı bir çalışmada iki amino asit sekansı saflaştırılarak IC₅₀ değerleri 95 µM ve 148 µM olarak bulunmuştur (Lee vd., 2011).

4.6. Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

4.6.1. ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit)) radikal katyonlarını süpürme analizi

4.6.1.1. Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının ABTS antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

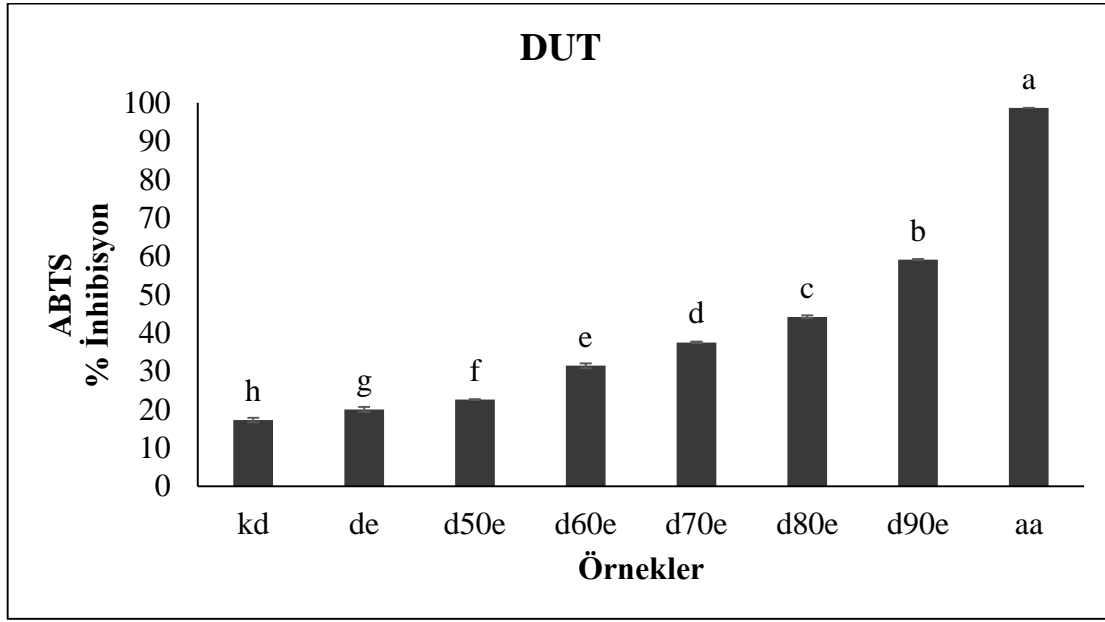
Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının ABTS antioksidan aktivite analiz sonuçları Çizelge 4.10' da belirtilmiştir.

Çizelge 4.10: Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının abts antioksidan aktivitesi değerleri.

Örnek	Dut ABTS Antioksidan Aktivitesi (% inhibisyon)	Örnek	Dut Yapracağı ABTS Antioksidan Aktivitesi (% inhibisyon)
kd	17.277±0.555 ^h	kdy	44.830±0.278 ^g
de	20.065±0.647 ^g	dye	93.987±0.370 ^b
d50e	22.614±0.000 ^f	dy50e	91.111±0.370 ^c
d60e	31.438±0.647 ^e	dy60e	84.575±0.739 ^d
d70e	37.516±0.185 ^d	dy70e	83.399±0.370 ^e
d80e	44.183±0.370 ^c	dy80e	82.418±0.277 ^e
d90e	59.150±0.092 ^b	dy90e	78.889±0.647 ^f
aa	98.691±0.000 ^a	aa	98.691±0.000 ^a

Sonuçlar; ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0.05$). Dut örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **de**: ısıtma işlemi uygulanmayan örneğin protein ekstraktı, **d50e**: 50°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı, **d60e**: 60°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı, **d70e**: 70°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **d80e**: 80°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **d90e**: 90°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **kd**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan) Dut yaprağı örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **dye**: ısıtma işlemi uygulanmayan örneğin protein ekstraktı, **dy50e**: 50°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı, **dy60e**: 60°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı, **dy70e**: 70°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **dy80e**: 80°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **dy90e**: 90°C' de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **kdy**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan) Pozitif kontrol örneği, **aa**: askorbik asit olarak isimlendirilmiştir.

Dut örneklerinden elde edilen protein ekstraktlarına ait Şekil 4.21 incelendiğinde ısıl işlem uygulamasının antioksidan kapasiteyi arttırdığı görülmektedir. En yüksek inhibisyon oranının 90°C’de ısıl işlem uygulanan protein ekstraktına ait olduğu görülmektedir. Hiçbir işlem uygulanmayan kuru örnek ile kıyaslandığında ekstrakte edilen bütün örneklerin aktivitesinin istatistiksel olarak arttığı görülmektedir ($P<0.05$).



Şekil 4.21: Dut protein ekstraktlarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri.

“4.3. Protein Ekstraksiyon Veriminin Belirlenmesi” kısmında tartışıldığı üzere dut örneklerinde sıcaklık arttıkça protein ekstraksiyon verimi istatistiksel derecede düşmektedir. Özellikle 70°C ve daha yüksek sıcaklıklarda protein oranı % 50’nin altına düşmeye başlamıştır. Ancak örneklerin antioksidan aktivitesinde sıcaklık arttıkça artma görülmektedir, bu durumda peptitlerin dışında başka maddelerin de girişim yaparak aktiviteyi etkilediği söylenebilir.

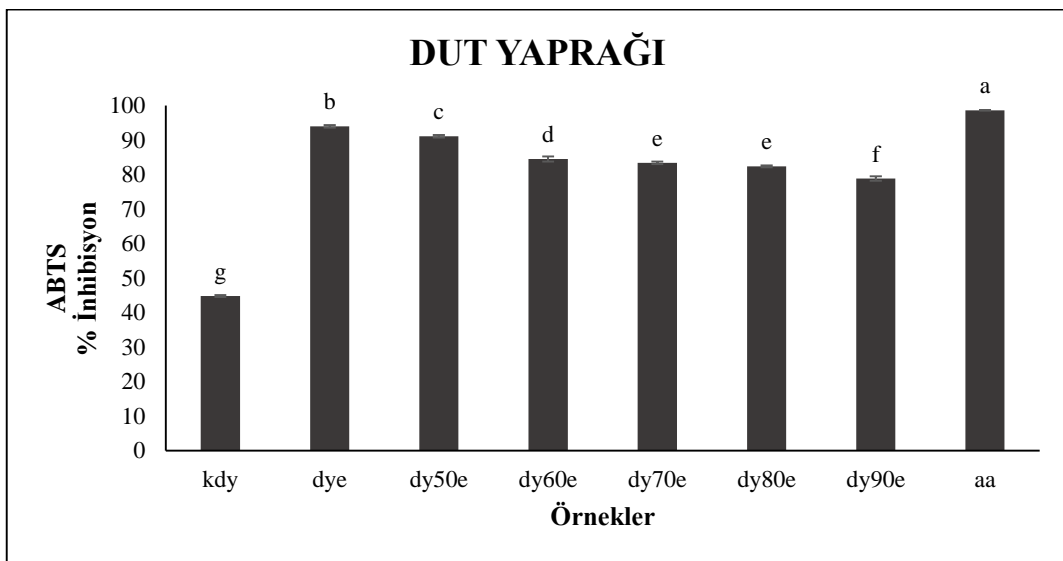
Dutta bulunan alkaloidler ve flavonoidler gibi biyoaktif bileşenlerin özellikle antioksidan aktiviteyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Dut meyvesindeki en önemli antioksidan bileşiklerin polifenol sınıfının bileşenlerinden suda çözünür antosiyaninler olduğu belirtilmektedir (Zhang vd., 2018).

Dut meyvesi üzerine yapılan bir çalışmada dut meyvesinde bulunan ve suyla ekstrakte edilen polisakkaritlerin yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Chen vd., 2016).

Homoproteinlerin yapısında yalnızca aminoasitler yer alırken heteroproteinlerin yapısında ise aminoasitlerin yanısıra prostetik grup olarak isimlendirilen ve protein yapısında olmayan nükleoproteinler, lipoproteinler, glikoproteinler, fosfoproteinler, hemoproteinler ve metalloproteinler gibi değişik bileşikler bulunmaktadır (Saldamlı, 2007).

Soya fasulyesinin biyoaktif peptit karakterizasyonunun araştırıldığı bir çalışmada proteinler oligopeptitlere tamamen hidrolize edilemediği ve sebep olarak soyada bulunan fosfoproteinler, glikoproteinler ve diğer translasyonel türlerin daha fazla sayıda disülfid bağı içermelerinden dolayı proteinlerin parçalanmasını zorlaştırdığı ifade edilmiştir (Gibbs vd., 2003).

Dut yaprağı örneklerinden elde edilen protein ekstraktlarına ait Şekil 4.22 incelendiğinde ise, hiçbir işlem uygulanmayan kuru örnek ile kıyaslandığında ekstraksiyon işleminin antioksidan kapasiteyi istatistiksel olarak arttırdığı ve en yüksek inhibisyon oranının dye örneğine ait olduğu görülmektedir. Isıl işlem uygulanan örnekler kendi aralarında değerlendirildiğinde en yüksek aktivitenin dy50 örneğine ait olduğu ve sıcaklık arttıkça antioksidan aktivitenin istatistiksel olarak azaldığı ve en düşük aktivitenin dy90 örneğine ait olduğu görülmektedir ($P<0.05$).



Şekil 4.22: Dut yaprağı protein ekstraktlarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri.

4.6.1.2. Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının ABTS antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

Pepsinle muamele edilen dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının ABTS antioksidan aktivitesinin sonuçları Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11: Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri.

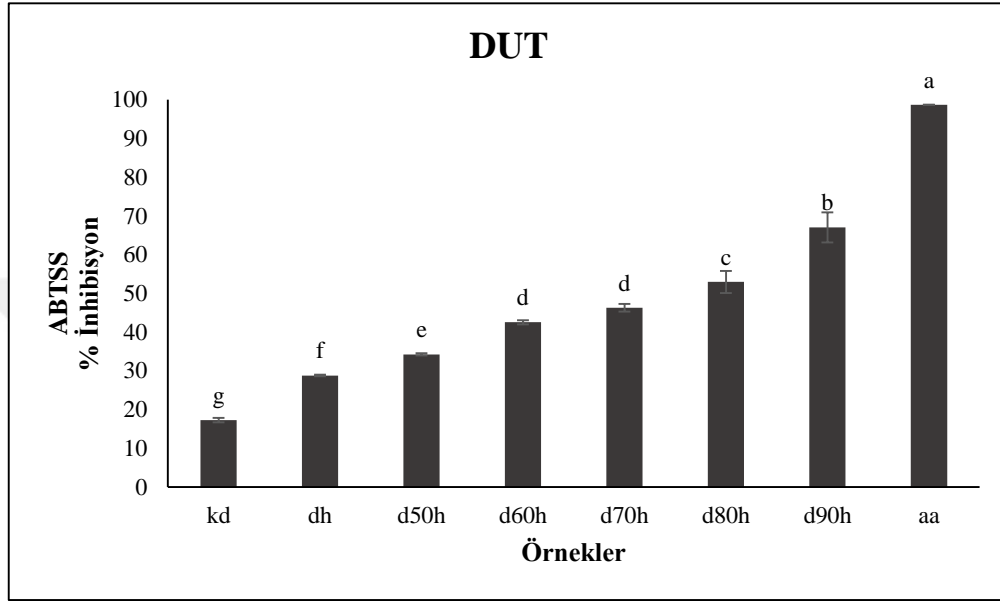
Örnek	Dut ABTS Antioksidan Aktivitesi (% inhibisyon)	Örnek	Dut Yaprığı ABTS Antioksidan Aktivitesi (% inhibisyon)
kd	17.277±0.555 ^g	kdy	44.830±0.278 ^e
dh	28.796±0.185 ^f	dyh	96.270±1.203 ^b
d50h	34.228±0.278 ^e	dy50h	94.961±1.203 ^{bc}
d60h	42.539±0.555 ^d	dy60h	94.306±1.388 ^{bc}
d70h	46.270±1.018 ^d	dy70h	93.848±0.740 ^{cd}
d80h	52.945±2.869 ^c	dy80h	93.455±0.740 ^{cd}
d90h	67.016±3.887 ^b	dy90h	91.950±1.203 ^d
aa	98.691±0.000 ^a	aa	98.691±0.000 ^a

Sonuçlar; ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0.05$). Dut örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **dh**: ısı işlem uygulanmayan örneğin protein hidrolizati, **d50h**: 50°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d60h**: 60°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d70h**: 70°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d80h**: 80°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d90h**: 90°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **kd**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan). Dut yaprağı örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **dyh**: ısı işlem uygulanmayan örneğin protein hidrolizati, **dy50h**: 50°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **dy60h**: 60°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **dy70h**: 70°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati **dy80h**: 80°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati **dy90h**: 90°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **kdy**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan). Pozitif kontrol örneği **aa**: askorbik asit olarak isimlendirilmiştir.

Dut örneklerinden elde edilen protein hidrolizatlarına ait Şekil 4.23 incelendiğinde ısı işlem uygulamasının antioksidan kapasiteyi arttırdığı görülmektedir. En yüksek inhibisyon oranının 90°C’de ısı işlem görmüş protein hidrolizatına ait olduğu görülmektedir. Hiçbir işlem uygulanmayan kuru dut örneği ile kıyaslandığında hidrolize edilen bütün örneklerin aktivitesinin istatistiksel olarak arttığı görülmektedir ($P<0.05$).

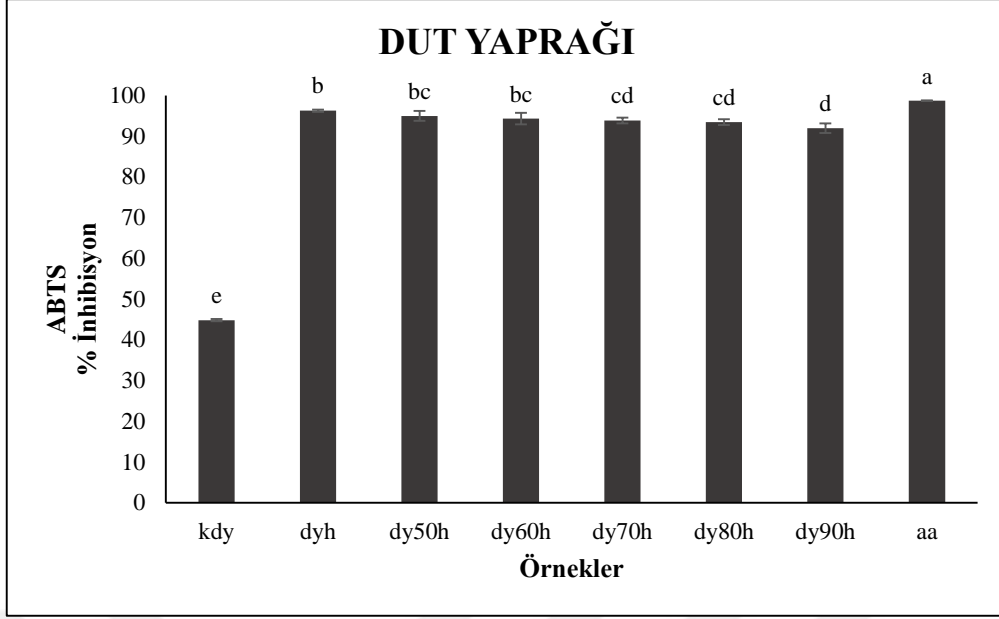
Sonuçlar değerlendirildiğinde daha önce tartışıldığı üzere; sıcaklık arttıkça proteinlerin hidrolizasyon verimi düşmektedir. Ancak tam tersine sıcaklık arttıkça antioksidan aktivite artmıştır. Hidroliz derecesinin artması ile antioksidan aktivite gösteren peptit zincirinin biyoaktif yapısı parçalanıyor olabilir veya örneklerin protein kapasitelerinin dışında başka bileşenlerden kaynaklı da antioksidan kapasite olduğu söylenebilir.

Yoğurt peptitlerinin biyoaktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada örnekler analize alınmadan önce şeker ve laktik asit bileşenleri katyon değiştirici kolon yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Farvin vd., 2010). Bu çalışmanın sonuçları ile kıyaslandığında dut örneğinde bulunan şekerli bileşenlerin yapıdan uzaklaştırılmamasından dolayı antioksidan aktivitenin etkilenmiş olduğu düşünülebilir.



Şekil 4.23: Dut protein hidrolizatlarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri.

Dut yaprağı örneklerinden elde edilen protein hidrolizatlarına ait Şekil 4.24 incelendiğinde ise, hiçbir işlem uygulanmayan kuru dut yaprağı örneği ile kıyaslandığında hidrolizasyon işleminin antioksidan kapasiteyi arttırdığı ve en yüksek inhibisyon oranının dyh, dy50h ve dy60h örneklerine ait olduğu görülmektedir. Daha yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça antioksidan aktivitenin bir miktar azaldığı ancak yine de % 90'ın üzerinde aktivite olduğu ve ısı işlem uygulamasının antioksidan aktivite üzerinde etkili olduğu görülmektedir ($P<0.05$).



Şekil 4.24: Dut yaprağı protein hidrolizatlarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri.

Dut protein ekstraktları ve hidrolizatlarının antioksidan kapasitelerinin beraber değerlendirildiği durumda hidrolizatların aktivitesinin daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Her ne kadar dut örneklerinde proteinler dışında başka bileşenler girişim yapmış olsalar dahi hidrolizatların aktivitesinin daha yüksek olması mevcut bulunan proteinlerin de bir miktar antioksidan kapasitesinin olduğunu göstermektedir.

Dut yaprağı ekstraktları ve hidrolizatları kendi aralarında kıyaslandığında ise hidrolizatların antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

Dut yaprağı proteinleri ve hidrolizatlarının antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada pepsinle sindirim prosesinde dut yaprağı protein hidrolizatlarının ABTS süpürme aktivitesinin, dut yaprağı protein ekstraktlarına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Sun vd., 2018).

4.6.2. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme analizi

4.6.2.1. Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının DPPH antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

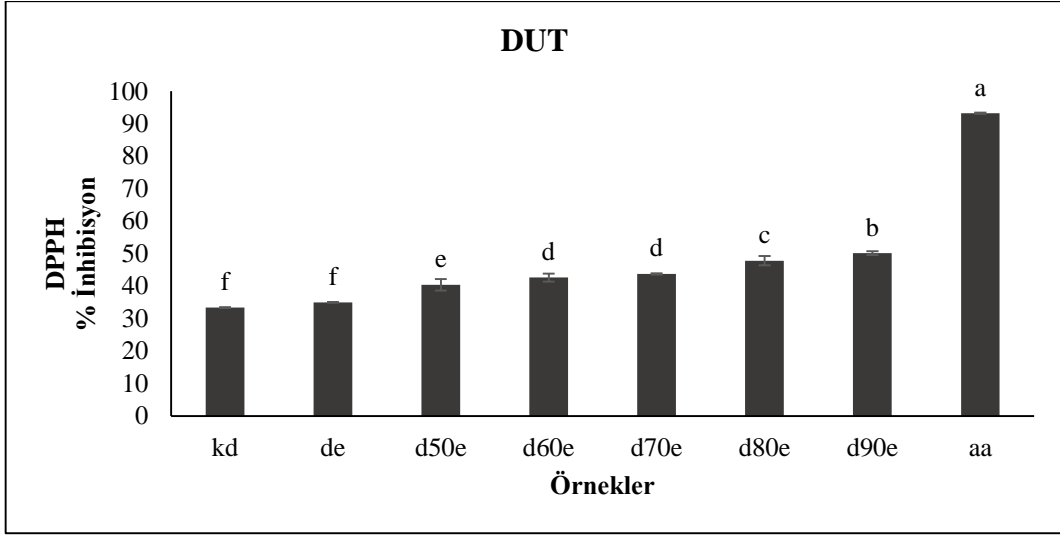
Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının DPPH antioksidan aktivite analiz sonuçları Çizelge 4.12’ de belirtilmiştir.

Çizelge 4.12: Dut ve dut yaprağı protein ekstraktlarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri.

Dut		Dut Yaprığı	
Örnek	DPPH Antioksidan Aktivitesi (% inhibisyon)	Örnek	DPPH Antioksidan Aktivitesi (% inhibisyon)
kd	33.355±0.094 ^f	kdy	38.064±0.375 ^g
de	34.947±0.094 ^f	dye	90.915±0.281 ^b
d50e	40.385±1.782 ^e	dy50e	90.186±0.188 ^{bc}
d60e	42.639±1.219 ^d	dy60e	89.125±0.375 ^{cd}
d70e	43.767±0.188 ^d	dy70e	88.926±0.094 ^d
d80e	47.812±1.407 ^c	dy80e	87.334±0.469 ^e
d90e	50.133±0.563 ^b	dy90e	79.244±1.032 ^f
aa	93.236±0.188 ^a	aa	93.236±0.188 ^a

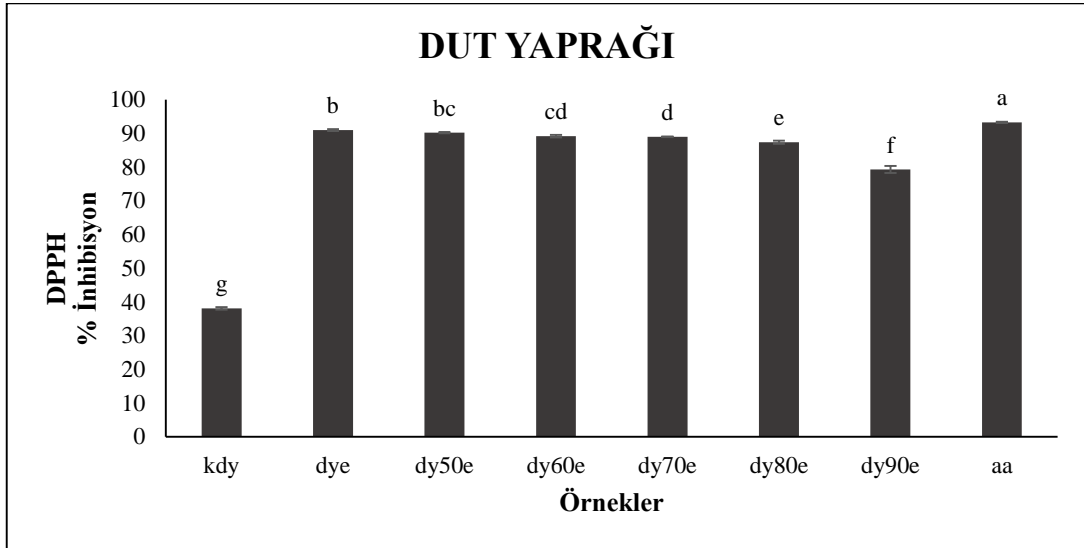
Sonuçlar; ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0.05$). Dut örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **de**: ısıtma işlemi uygulanmayan örneğin protein ekstraktı, **d50e**: 50°C’ de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı, **d60e**: 60°C’ de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı, **d70e**: 70°C’ de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **d80e**: 80°C’ de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **d90e**: 90°C’ de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **kd**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan) Dut yaprağı örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **dye**: ısıtma işlemi uygulanmayan örneğin protein ekstraktı, **dy50e**: 50°C’ de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı, **dy60e**: 60°C’ de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı, **dy70e**: 70°C’ de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **dy80e**: 80°C’ de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **dy90e**: 90°C’ de ısıtma işlemi uygulanan örneğin protein ekstraktı **kdy**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan) Pozitif kontrol örneği, **aa**: askorbik asit olarak isimlendirilmiştir.

Dut örneklerinden elde edilen protein ekstraktlarına ait Şekil 4.25 incelendiğinde ısıtma işlemi uygulamasının antioksidan kapasiteyi arttırdığı görülmektedir. En yüksek inhibisyon oranının 90°C’ de ısıtma işlemi uygulanan protein ekstraktına ait olduğu görülmektedir. Hiçbir işlem uygulanmayan kuru örnek ile kıyaslandığında ekstrakte edilen bütün örneklerin aktivitesinin istatistiksel olarak arttığı görülmektedir ($P<0.05$). Sıcaklık arttıkça örneklerin daha önceden tespit edildiği üzere protein değerleri azalırken antioksidan aktivitenin artması başka maddelerin de aktivite üzerinde girişim yaptığını göstermektedir.



Şekil 4.25: Dut protein ekstraktlarının DPPH antioksidan aktivitesi değerleri.

Dut yaprağı örneklerinden elde edilen protein ekstraktlarına ait Şekil 4.26 incelendiğinde ise, hiçbir işlem uygulanmayan örnek ile diğer örnekler kıyaslandığında ekstraksiyon işleminin antioksidan kapasiteyi istatistiksel olarak arttırdığı ve en yüksek inhibisyon oranının dye ve dy50e örneklerine ait olduğu görülmektedir. Sıcaklık arttıkça antioksidan aktivitenin azaldığı ve en düşük aktivitenin dy90e örneğine ait olduğu görülmektedir ($P < 0.05$).



Şekil 4.26: Dut yaprağı protein ekstraktlarının DPPH antioksidan aktivitesi değerleri.

4.6.2.2. Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının DPPH antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

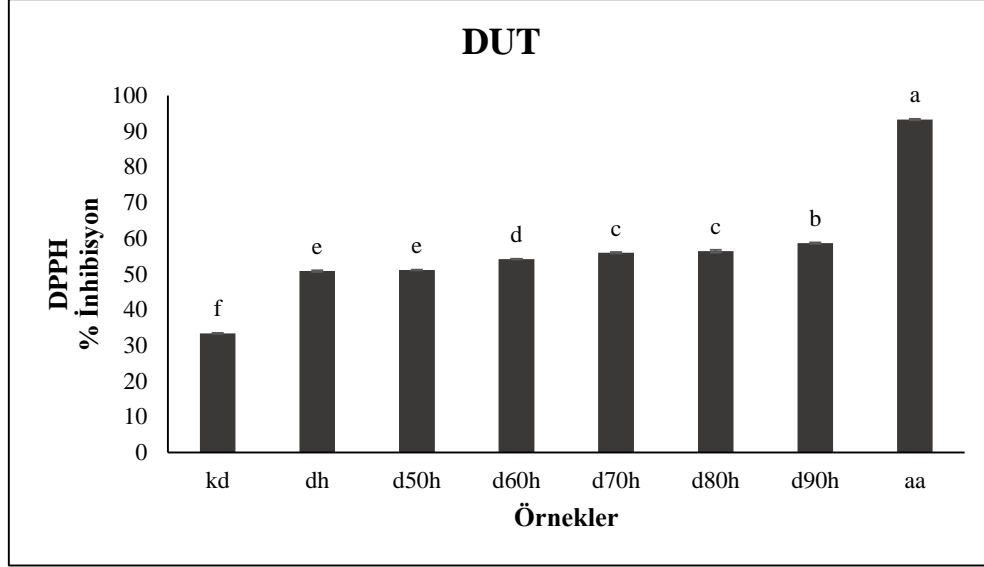
Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının DPPH antioksidan aktivitesinin sonuçları Çizelge 4.13’ te gösterilmiştir.

Çizelge 4.13: Dut ve dut yaprağı protein hidrolizatlarının DPPH antioksidan aktivitesi değerleri.

Örnek	Dut DPPH Antioksidan Aktivitesi (% inhibisyon)	Örnek	Dut Yaprığı DPPH Antioksidan Aktivitesi (% inhibisyon)
kd	33.355±0.094 ^f	kdy	38.064±0.375 ^f
dh	50.796±0.188 ^e	dyh	97.878±0.187 ^a
d50h	51.127±0.094 ^e	dy50h	96.751±0.093 ^b
d60h	54.178±0.093 ^d	dy60h	94.960±0.188 ^c
d70h	55.968±0.188 ^c	dy70h	94.496±0.281 ^c
d80h	56.366±0.375 ^c	dy80h	90.053±0.187 ^e
d90h	58.621±0.187 ^b	dy90h	89.721±0.281 ^e
aa	93.236±0.188 ^a	aa	93.236±0.188 ^d

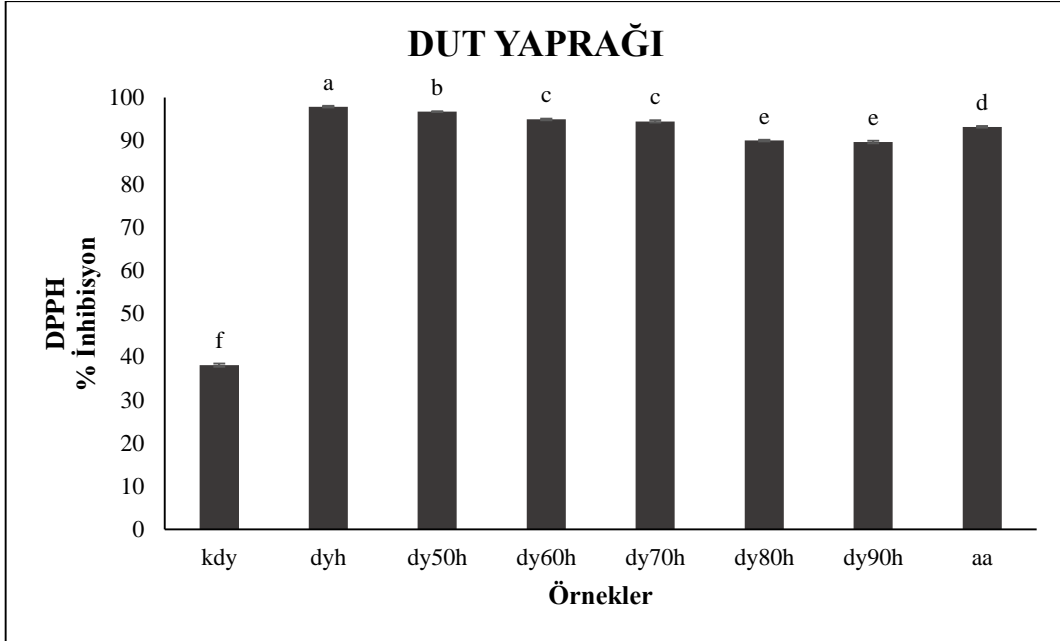
Sonuçlar; ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0.05$). Dut örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **dh**: ısı işlem uygulanmayan örneğin protein hidrolizati, **d50h**: 50°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d60h**: 60°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d70h**: 70°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d80h**: 80°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **d90h**: 90°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **kd**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan). Dut yaprağı örneklerine ait isimlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır; **dyh**: ısı işlem uygulanmayan örneğin protein hidrolizati, **dy50h**: 50°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **dy60h**: 60°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **dy70h**: 70°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati **dy80h**: 80°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati **dy90h**: 90°C’ de ısı işlem uygulanan örneğin protein hidrolizati, **kdy**: kuru örnek (hiçbir işlem uygulanmayan). Pozitif kontrol örneği **aa**: askorbik asit olarak isimlendirilmiştir.

Dut örneklerinden elde edilen protein hidrolizatlarına ait Şekil 4.27 incelendiğinde örneklere ısı işlem uygulamasının antioksidan aktiviteyi arttırdığı görülmektedir. En yüksek aktivitenin 90°C’ de ısı işlem görmüş protein hidrolizatına ait olduğu görülmektedir. Hiçbir işlem uygulanmayan örnek ile kıyaslandığında hidrolize edilen bütün örneklerin aktivitesinin istatistiksel olarak arttığı görülmektedir ($P<0.05$).



Şekil 4.27: Dut protein hidrolizatlarının DPPH antioksidan aktivitesi değerleri.

Dut yaprağı protein hidrolizatına ait Şekil 4.28 incelendiğinde ise, hiçbir işlem uygulanmayan örnek ile kıyaslandığında hidroliz işleminin antioksidan kapasiteyi istatistiksel olarak arttırdığı ve en yüksek inhibisyon oranının dyh örneğine ait olduğu görülmektedir. Sıcaklık şiddeti arttıkça antioksidan aktivitenin bir miktar azaldığı ancak yine de antioksidan kapasitesinin çok yüksek olduğu ve ısıl işlem uygulamasının antioksidan aktivite üzerinde etkili olduğu görülmektedir ($P < 0.05$).



Şekil 4.28: Dut yaprağı protein hidrolizatlarının DPPH antioksidan aktivitesi değerleri.

Pepsinle ön-hidrolize edilen soya proteinleriyle yapılan bir çalışmada DPPH radikal süpürme aktivitesi en yüksek %51.9 olarak bulunmuştur.

Deve sütü kazeini ve deve sütü peynir altı suyu proteinlerinin pepsin enzimi ile hidrolize edildiği çalışmada peptitlerin antioksidan aktiviteleri DPPH süpürme deneyi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak deve sütü kazeini ve peynir altı suyu proteinlerinin önemli miktarda antioksidan özellikte biyoaktif peptitlere sahip olduğu ve oksidatif stresle ilişkili hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde potansiyel peptitler olabileceklerini bulunmuştur (İbrahim vd., 2018).

Dut yaprağı proteinleri ve hidrolizatlarının antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada pepsin sindirimi sırasında daha fazla hidrofobik aminoasitlerin ortaya çıktığı ve bu durumun peptitlerin DPPH radikaline kolayca yakalanma imkanı oluşturduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmanın sonuçlarına göre pepsinle sindirim prosesinde dut yaprağı protein hidrolizatlarının DPPH radikal süpürme aktivitesinin (%85-80), dut yaprağı protein ekstraktlarına (%70-80) göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Sun vd., 2018).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında kuru dut ve kuru dut yaprağı örneklerinden elde edilen protein ekstraktları, hidrolizatları ve fraksiyonlarının ACE inhibisyon ve antioksidan aktiviteleri incelenerek sonuçları ortaya konulmuştur.

Sonuçlara bakılacak olursa dut örnekleri içinde istatistiksel olarak en yüksek ACE inhibisyon aktivitesinin 50°C'de ısıtılarak hazırlanan dut örneğine (d50) ait olduğu görülmektedir ($P<0.05$). (Ekstraktın protein miktarı; 69.51 ± 0.34 g/100g kuru ağırlık, hidrolizatın amino asit içeriği; 191.37 ± 0.435 mg Leu/g ka). d50 örneğinin ACE inhibisyon aktivitesi değerlerine bakıldığında protein ekstraktının % 86.00 ± 0.36 , hidrolizatının % 76.02 ± 0.32 aktivite gösterdiği ve fraksiyonları arasında molekül ağırlığı 3kDa'nun altındaki fraksiyonun (% 75.43 ± 0.21) 10 kDa'nun altındaki fraksiyondan (% 49.63 ± 1.71) daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür. Ayrıca d50 örneğinin IC_{50} değerinin 0.061mg /mL olduğu belirlenmiştir. Diğer dut örnekleri ile kıyaslandığında sıcaklık şiddeti arttıkça ACE inhibisyon aktivitesinin azaldığı ve en düşük aktivitenin 90°C'de ısıtılarak hazırlanan dut örneğine (d90) ait olduğu belirlenmiştir. Ancak antioksidan kapasitesi açısından dut örnekleri kıyaslandığında antihipertansif etkinin aksine sıcaklık şiddeti arttıkça antioksidan kapasitenin arttığı ve en yüksek değerlerin 90°C'de hidrolize edilen örneğe (d90h) ait olduğu (ABTS antioksidan aktivitesi % 67.016 ± 3.887 ve DPPH antioksidan aktivitesi % 58.621 ± 0.187) belirlenmiştir.

Dut yaprağı sonuçlarına bakılacak olursa en yüksek ACE inhibisyon aktivitesinin 50°C'de ısıtılarak hazırlanan dut yaprağı örneğine (dy50) ait olduğu görülmektedir ($P<0.05$). (Ekstraktın protein miktarı; 89.79 ± 0.13 g/100g kuru ağırlık, hidrolizatın amino asit içeriği; 266.75 ± 1.740 mg Leu/g ka). dy50 örneğinin ACE inhibisyon aktivitesi değerlerine bakıldığında protein ekstraktının % 69.66 ± 0.09 , hidrolizatının % 85.43 ± 0.36 aktivite gösterdiği ve fraksiyonları arasında molekül ağırlığı 3kDa'nun altındaki fraksiyonun (% 76.28 ± 0.23) 10 kDa'nun altındaki fraksiyonuyla (% 77.60 ± 0.15) benzer aktivite gösterdiği görülmüştür. Ayrıca dy50 örneğinin IC_{50} değerinin 0.107 mg/mL olduğu belirlenmiştir. Diğer dut yaprağı örnekleri ile kıyaslandığında sıcaklık şiddeti arttıkça ACE inhibisyon aktivitesinin azaldığı ve en düşük aktivitenin dy90 örneğine ait olduğu belirlenmiştir. Antioksidan kapasitesi açısından dut yaprağı örnekleri kıyaslandığında antihipertansif etkiyle benzer şekilde sıcaklık şiddeti arttıkça antioksidan kapasitenin

azaldığı ve en yüksek aktivitenin dyh (ABTS antioksidan aktivitesi %96.270±1.203 ve DPPH antioksidan aktivitesi %97,878±0.187) örneğine ait olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmaya devam edilmesi durumunda ACE inhibisyon ve antioksidan aktivitesine sahip olan peptitlerin kromatografik yöntemlerle peptit profili araştırılabilir ve bu peptitler saflaştırılarak aminoasit dizilimlerinin belirlenmesi sağlanabilir.

Biyoaktif peptit üretimi biyokimyasal yöntemlere alternatif olarak in silico metotlarla gerçekleştirilebilir (Panyayai vd., 2019) ve muhtemel biyoaktif peptit bölümleri veri tabanlarıyla karşılaştırılarak daha hızlı bir şekilde yol haritası oluşturulup ileri analiz aşamalarına geçilebilir.

Sonraki çalışmalarda dut ve dut yaprağı örnekleri farklı formlarda (kuru örnek, protein ekstraktı, hidrolizatı ve farklı molekül ağırlığındaki fraksiyonları) oral yolla deney hayvanları üzerinde denenerek bu bileşenlerin in vivo aktivite sonuçları araştırılabilir.

Dut örneklerinde peptitlerden kaynaklı antioksidan etkisinin daha net bir şekilde ortaya koyulabilmesi için sonraki çalışmalarda katyon değiştirici kolon veya başka metodlar kullanılarak dutun şekerden arındırılması ve protein yüzdesinin artması sağlanabilir.

Isıl işlem ve enzimatik hidroliz uygulamalarının, dut ve dut yaprağından ticari değeri olan biyoaktif peptit üretiminde faydalı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca elde edilecek peptitlerin antihipertansif (ACE inhibitörü) ve antioksidan gibi sağlığa yararlı etkileri nedeniyle gıdaların zenginleştirilmesinde veya fonksiyonel gıda üretiminde değerlendirilme potansiyelleri bulunmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Akpınar, A. & Uysal, H.R.** (2013). Gıda kaynaklı antihipertensif peptitlerin biyoyararlılığı, üretimi ve ilaç olarak kullanım olanakları. *Gıda*. 38 (3):167-174.
- Al-Kirshi, R. A., Alimon, A. R., Zulkifli, I., Zahari, M. W. & Sazli, A. Q.** (2009). The chemical composition and nutritive value of mulberry leaf as a protein source in poultry diets. In Proceeding The 1st International Seminar on Animal Industry. *Faculty of Animal Science, Bogor Agricultural University*. hlm (pp. 98-102).
- Anonim.** (2016a). Ana ve alt gruplara göre bitkisel üretim değerleri ve bir önceki yıla göre değişim oranları, TÜİK, Tarım İstatistikleri Özeti Yayını, Ankara.
- Anonim.** (2016b). Bitkisel Ürün Denge Tabloları; "Meyveler, sert kabuklular ve içecek bitkileri, TÜİK, Tarım İstatistikleri Özeti Yayını, Ankara.
- Appel, L.J., Moore, T.J., Obarzanek, E., Wollmer, W.M. & Svetkey, L.P.** (1997). A Clinical Trial of the Effects of Dietary Patterns on Blood Pressure. *New England journal of medicine*. 336, 1117-1124.
- Arimboor, R. & Arumughan, C.** (2011). Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) proanthocyanidins inhibit in vitro enzymatic hydrolysis of protein. *Journal of Food Science*. 76 (6), 130-137.
- Arrutia, F., Puente, Á., Riera, F. A., Menéndez, C. & González, U. A.** (2016). Influence of heat pre-treatment on BSA tryptic hydrolysis and peptide release. *Food chemistry*, 202, 40-48.
- Association of Official Analytical Chemists.** (1990). Official Methods of Analysis: Changes in Official Methods of Analysis Made at the Annual Meeting. Supplement (Vol. 15). Association of Official Analytical Chemists.
- Bakkalbaşı, E., Yemiş, O. & Artık, N.** (2004). Dut kurusunun fiziksel ve kimyasal özellikleri ile ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi. *Gıda*. 29(3), 203-209.
- Barbana, C. & Boye, J.I.** (2011). Anjiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry*, 127 (1): 94–101.

- Budak, N.** (2015). Dut sirkesi oluşum sürecinde ileri analitik tekniklerle toplam antioksidan aktivitesi ve fenolik bileşenleri. *Meyve Bilimi*, 2(2), 27-31.
- Carrizzo, A., Ambrosio, M., Damato, A., Madonna, M., Storto, M., Capocci, L., Campiglia, P., Sommella, E., Trimarco, V., Rozza, F., Izzo, R., Puca, A.A. & Vecchione, C.** (2016). Morus alba extract modulates blood pressure homeostasis through enos signaling. *Molecular Nutrition & Food Research*. 60, 2304–2311.
- Chakrabarti, S., Jahandideh, F., Wu, J.** (2014). Food-Derived Bioactive Peptides on Inflammation and Oxidative Stress. *BioMed research international*, pp. 12.
- Chalamaiah, M., Ulug, S. K., Hong, H., & Wu, J.** (2019). Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins. *Journal of Functional Foods*, 58, 123-129.
- Chen, C., You, L.J., Abbasi, A.M., Fu, X., Liua, R.H. & Li, C.** (2016). Characterization of polysaccharide fractions in mulberry fruit and assessment of their antioxidant and hypoglycemic activities in vitro. *Food & function*. 7, 530-539.
- Choi, H. S., Cho, H. Y., Yang, H. C., Ra, K. S. & Suh, H. J.** (2001). Anjiotensin I-converting enzyme inhibitor from Grifola frondosa. *Food Research International*, 34(2-3), 177-182.
- Da Costa, E. L., Da Rocha Gontijo, J. A. & Netto, F. M.** (2007). Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *International dairy journal*, 17: 632-640.
- Damodaran, S.** (2017). Food proteins and their applications. Routledge.
- Eroğlu, E.Ç.** (2014). Spirulina protein hidrolizatlarının antihipertansif etkisinin (Ace inhibisyon aktivitesinin) belirlenmesi (pp: 18-33). Fonksiyonel gıdalarda biyoteknoloji uygulamaları sunumu. Rhode Island University, 15.12.2012-15.04.2013, Kingston.
- Farvin, K.S., Baron, C.P., Nielsen, N.S., Otte, J. & Jacobsen, C.** (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: part 2–characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry*, 123(4), 1090-1097.

- Fitzgerald, R.J. & Murray, B.A.** (2006). Bioactive peptide and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59:118-125.
- Friedman, M.** (1996). Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 6-29.
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G. & Añón, M. C.** (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry*, 126(3), 878-884.
- Fujita, H., Yokoyama, K. & Yoshikawa, M.** (2000). Classification and antihypertensive activity of anjiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J Food Sci*, 65:564-9.
- García, M. C., Puchalska, P., Esteve, C., & Marina, M. L.** (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106, 328-349.
- Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R., Mulligan, C.** (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food research international*, 37(2), 123-131.
- Gryn-Rynko, A., Bazylak, G., Olszewska-Slonina, D.** (2016). New potential phytotherapeutics obtained from white mulberry (*Morus alba* L.) leaves, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 84, 628-636.
- Guang, C. & Phillips, R. D.** (2009). Plant food-derived anjiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5113-5120.
- Hancock, R.E.W. & Sahl H.G.** (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*, 24(12):1551–1557.
- Hartmann, R. & Meisel, H.** (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 163-169.
- Hayaloğlu, A.A.**, (2003). Starter olarak kullanılan bazı lactococcus suşlarının beyaz peynirlerin özellikleri ve olgunlaşmaları üzerine etkileri. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.

- Hernández-Ledesma, B., Quirós, A., Amigo, L. & Recio, I.** (2007). Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy of Journal*, 17:42-49.
- Hirose, M.** (1993). Molten globule state of food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 4: 48-51.
- Huo, Y.,** (2002). Mulberry Cultivation and Utilization in China. Mulberry for Animal Production, FAO Animal Production and Health Paper 147: 11-44.
- IDF** (1993). Milk. Determination of the nitrogen (Kjeldahl method) and calculation of the crude protein content. IDF Standard 20B. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Ibrahim, H. R., Isono, H. & Miyata, T.** (2018). Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins. *Animal Nutrition*, 273-280.
- Iroyukifujita, H., Eiichiyokoyama, K. & Yoshikawa, M.** (2000). Classification and antihypertensive activity of anjiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science*, 65(4), 564-569.
- Jha, S., Mandal, P., Bhattacharyya, P. & Ghosh, A.** (2014). Free-radical scavenging properties of low molecular weight peptide(s) isolated from S1 cultivar of mulberry leaves and their impact on Bombyx mori (L.) (Bombycidae). *Journal of Science and Biotechnology*. 5, 16.
- Kang, D.G., Hur, T.Y., Lee, G.M., Oh, H., Kwon, T.O., Sohn, E.J. & Lee, H.S.** (2002). Effects of Cudrania tricuspidata water extract on blood pressure and renal functions in NO-dependent hypertension. *Life Sciences*. 70, 2599–2609.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N. & Marshall, M.** (2012). Food Proteins and Peptides as Bioactive Agents. Bioactive Food Proteins and Peptides: Applications in Human Health, Eds: N. S. Hettiarachchy. CRC Press, Taylor And Francis Group, Boca Raton, pp. 1-27.
- Khan, M.S., Chen, C. & Fu, X.** (2019). The effect of geographic variation on chemical composition, antioxidant and hypoglycemic activities of Morus alba L. Polysaccharides. *Journal of Food Processing And Preservation*. 43, e14206.

- Kımk, Ö. & Gürsoy, O.** (2002). Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptitler. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(2), 195-203.
- Kim, J. M., Whang, J.H. & Suh, H.J.** (2004). Enhancement of anjiotensin 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.
- Kitts, D. D. & Weiler, K.** (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1309-1323.
- Korhonen, H. J.** (2009). Bioactive milk proteins and peptides: from science to functional applications. *Australian Journal of Dairy Technology*, 64(1), 16.
- Kumar, K., Mohan, M., Tiwari, N. & Kumar, S.** (2018). Production potential and leaf quality evaluation of selected mulberry (*Morus alba*) clones. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2), 482-486.
- Kurniati, N.F., Suryani, G.P. & Sigit, J.I.** (2014). Vasodilator effect of ethanolic extract of mulberry leaves (*Morus alba* L.) in rat and rabbit. *Procedia Chemistry*, 13, 142 – 146.
- La Fuente, M. A., Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P. A. & Singh, H.** (2002). Process-induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. *International Dairy Journal*, 12: 361-369.
- Lee, J. K., Jeon, J. K. & Byun, H. G.** (2011). Effect of anjiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from skate skin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125(2), 495-499.
- Li, G. H., Wan, J. Z., Le, G. W. & Shi, Y. H.** (2006). Novel anjiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from Alcalase hydrolysate of mung bean protein. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, 12(8), 509-514.
- Li, Y., Yu, J.** (2015). Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides. *Journal of Medicinal Food*, 18: 147–156.

- López-Fandiño, R., Otte, J. & Van Camp, J.** (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16(11), 1277-1293.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Gomez, B., Barba, F. J., Mora, L., Perez-Santaescolastica, C. & Toldra, F.** (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 136-147.
- Ma, M. S., Bae, I. Y., Lee, H. G. & Yang, C. B.** (2006). Purification and identification of anjiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Food Chemistry*, 96(1), 36-42.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G. & Garg, M. L.** (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2046-2056.
- Mahmood, T., Anwar, F., Afzal, N., Kausar, N., Ilyas, S. & Shoaib, M.** (2017). Influence of ripening stages and drying methods on polyphenolic content and antioxidant activities of mulberry fruits. *Food Measure*. 11, 2171–2179.
- Majumder, K., & Wu, J.** (2011). Purification and characterisation of anjiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysate of ovotransferrin. *Food Chemistry*, 126(4), 1614-1619.
- Martin, M., & Deussen, A.** (2019). Effects of natural peptides from food proteins on anjiotensin converting enzyme activity and hypertension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(8), 1264-1283.
- Mazorra-Manzano, M. A., Ramírez-Suarez, J. C. & Yada, R. Y.** (2017). Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17.
- Miguel, M., Contreras, M.M., Recio, I. & Aleixandre, A.,** (2009), ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate, *Food Chemistry*, 112:211-214.

- Mirzapour, M., Rezaei, K., Sentandreu, M. A., & Moosavi-Movahedi, A. A.** (2016). In vitro antioxidant activities of hydrolysates obtained from Iranian wild almond (A mygdalus scoparia) protein by several enzymes. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(3), 609-616.
- Mirzapour, M., Rezaei, K. & Sentandreu, M.A.** (2017). Identification of potent ACE inhibitory peptides from wild almond proteins. *Journal of Food Science*. 82(10), 2421-2431.
- Moslehishad, M., Ehsani, M. R., Salami, M., Mirdamadi, S., Ezzatpanah, H., Naslaji, A. N. & Moosavi-Movahedi, A. A.** (2013). The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. *International Dairy Journal*, 29(2), 82-87.
- Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y. & Kuwata, T.** (2001). Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(1): 11-17.
- OH, K.S., HAN, W., WANG, M.H. & LEE, B.H.** (2007). The effects of chronic treatment with *Morus bombycis* Koidzumı in spontaneously hypertensive rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(7), 1278-1283.
- Otağ, F.B. & Hayta, M.** (2013). Gıdalar da biyoaktif peptit oluşumu ve aktivitesi üzerine ısı l işlem ve fermentasyonun etkileri. *Gıda*. 38 (5), 307-314.
- Pan, D., Luo, Y., & Tanokura, M.** (2005). Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004. *Food Chemistry*, 91(1), 123-129.
- Panyayai, T., Ngamphiw, C., Tongsim a, S., Mhuantong, W., Limsripraphan, W., Choowongkomon, K., & Sawatdichaikul, O.** (2019). PeptideDB: A web application for new bioactive peptides from food protein. *Heliyon*, 5(7), e02076.
- Park, S.Y., Lee J.S., Baek, H.H., Lee & H.G.** (2010). Purification and characterization of antioxidant peptides from soy protein hydrolysate. *Journal of Food Biochemistry*, 34:120–132.

- Patten, G.S., Abeywardena, M.Y. & Bennet, L.E.** (2016). Inhibition of anjiotensin converting enzyme, anjiotensin II receptor blocking, and blood pressure lowering bioactivity across plant families. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(2), 181-214.
- Paul, M. & Somkuti, G.A.** (2009). Degradation of milk-based bioactive peptides by yogurt fermentation bacteria. *Letters in applied microbiology*, 49:345-350.
- Pihlanto, A.** (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1306-1314.
- Pihlanto, A., Akkanen, S. & Korhonen, H.J.** (2008). ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*), *Food Chemistry*, 109:104-112.
- Pihlanto, A., Virtanen, T. & Korhonen, H.** (2010). Anjiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, 20(1), 3-10.
- Pihlanto-Leppälä, A.** (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 347-356.
- Pothinuch, P., Miyamoto, A., Nguyen, H.T.T. & Tongchitpakdee, S.** (2017). Vasodilatory effects of mulberry (*Morus* spp.) leaf extract on porcine cerebral arteries in vitro: Possible underlying mechanisms. *Journal of Functional Foods*, 38, 151-159.
- Pritchard, S. R., Phillips, M. & Kailasapathy, K.** (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5), 1545-1548.
- Puri, M.** (Ed.). (2017). *Food Bioactives: Extraction and Biotechnology Applications*. Springer.
- Quan, S., Tsuda, H., & Miyamoto, T.** (2008). Anjiotensin 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(15), 2688-2692.
- Saldamh, İ.** (2007). Gıda kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları.

- Saleh, A. S., Zhang, Q., & Shen, Q.** (2016). Recent research in antihypertensive activity of food protein-derived hydrolyzates and peptides, *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(5), 760-787.
- Schanbacher, F.L., Talhouk, R.S. & Murray, F.A.** (1997). Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Sci*, 50: 105-123.
- Srivastava, S., Kapoor, R., Thathola, A. & Srivastava, R.P.** (2006). Nutritional quality of leaves of some genotypes of mulberry (*Morus alba*), *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57 (5–6), 305–313.
- Su, X., Dong, C., Zhang, J., Su, L., Wang, X., Cui, H. & Chen, Z.** (2014). Combination therapy of anti-cancer bioactive peptide with Cisplatin decreases chemotherapy dosing and toxicity to improve the quality of life in xenograft nude mice bearing human gastric cancer. *Cell & Bioscience*, 4(1), 7.
- Suetsuna, K., Maekawa, K. & Chen, J. R.** (2004). Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(5), 267-272.
- Sulejmani, E. I., & Hayaloglu, A. A.** (2018). Characterisation of Macedonian white-brined cheese: Effect of raw or heat-treated caprine milk. *International Journal of Dairy Technology*, 71(2), 408-416.
- Sun, C., Wu, W., Yin, Z., Fan, L., Ma, Y., Lai, F. & Wu, H.** (2018). Effects of simulated gastrointestinal digestion on the physicochemical properties, erythrocyte haemolysis inhibitory ability and chemical antioxidant activity of mulberry leaf protein and its hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology*, 53, 282–295.
- Sahingil, D., Gokce, Y., Yuceer, M., & Hayaloglu, A. A.** (2019). Optimization of proteolysis and angiotensin converting enzyme inhibition activity in a model cheese using response surface methodology. *LWT*, 99, 525-532.
- Şahingil D., Hayaloğlu, A.A., Kırmacı, H.A., Özer, B. & Şimsek, O.** (2014). Changes of proteolysis and anjiotensin-I converting enzyme-inhibitory activity in white-brined cheese as affected by adjunct culture and ripening temperature, *Journal of Dairy Research*, 81 394–402.

- Şimşek, A. & Kılıç, B.** (2016). Et kaynaklı biyoaktif peptitler ve fonksiyonel özellikleri. *Gıda*, 41(4), 267-274.
- T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı. Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı (TürKomp).**
Available at: <http://www.turkomp.gov.tr/food-dut-beyaz-kuru-373>, Accessed 03.12.2019.
- Tavares, T. G., Contreras, M. M., Amorim, M., Martín-Álvarez, P. J., Pintado, M. E., Recio, I., & Malcata, F. X.** (2011). Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. *International Dairy Journal*, 21(12), 926-933.
- Tironi, V. A. & Añón, M. C.** (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International*, 43(1), 315-322.
- Urbanek Krajnc, A., Ugulin, T., Pausic, A., Rabensteiner, J., Bukovac, V., Mikulic Petkovsek, M., Janžekovič, F., Bakonyi, T., Lucijana Bercic, R. & Felicijan, M.** (2019). Morphometric and biochemical screening of old mulberry trees (*Morus alba L.*) in the former sericulture region of Slovenia. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 88(1), 3614.
- Vercruyse, L., Van Camp, J., Morel, N., Rougé, P., Herregods, G., & Smaghe, G.** (2010). Ala-Val-Phe and Val-Phe: ACE inhibitory peptides derived from insect protein with antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *Peptides*, 31(3), 482-488.
- Vermeirssen, V., van der Bent, A., Van Camp, J., van Amerongen, A. & Verstraete, W.** (2004). A quantitative in silico analysis calculates the anjiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests. *Biochimie*, 86(3), 231-239.
- Wang, C., Tian, J. & Wang, Q.** (2011). ACE inhibitory and antihypertensive properties of apricot almond meal hydrolysate. *European Food Research and Technology*, 232, 549–556.
- Wang, H., Li, Y., Cheng, Y., Yin, L. & Li, L.** (2013). Effect of the Maillard reaction on anjiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of douchi during fermentation. *Food Bioprocess Technology*, 6: 297-301.

- Wang, N., Hatcher, D. W., Tyler, R. T., Toews, R., & Gawalko, E. J.** (2010). Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International*, 43(2), 589-594.
- Wu, J. & Ding, X.** (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived anjotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International*, 35(4), 367-375.
- Yang, N.C., Jhou, K.Y. & Tseng, C.Y.** (2012). Antihypertensive effect of mulberry leaf aqueous extract containing aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*. 132, 1796-1801.
- Yang, X., Yang, L., & Zheng, H.** (2010). Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2374-2379.
- Yang, Y., Marczak, E. D., Usui, H., Kawamura, Y., & Yoshikawa, M.** (2004). Antihypertensive properties of spinach leaf protein digests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8), 2223-2225.
- Yao, J., Yan, B., Wang, X. Q., Liu, J. X.** (2000). Nutritional evaluation of mulberry leaves as feeds for ruminants. *Livestock Research for Rural Development*, 12(2), 9-16.
- Yuk, J.S., Lim, Y.H., Cho & H.Y.** (2000). Purification and characterization of anjotensin 1-converting enzyme inhibitors from *Sinapis alba* L. *Preventive Nutrition and Food Science*. 5(2), 75-80.
- Zambrowicz, A., Pokora, M., Setner, B., Dąbrowska, A., Szoltysik, M., Babij, K. & Chrzanowska, J.** (2015). Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: isolation and characterization. *Amino acids*, 47(2): 369-380.
- Zhang, H., Ma, Z.F., Luo, X. & Li, X.** (2018). Effects of mulberry fruit (*morus alba* l.) consumption on health outcomes: a mini-review. *Antioxidants*. 7, 69.
- Zhou, H. J., Ye, Z. W., Su, M. S., Du, J. H. & Li, X. W.** (2015). Effect of Heat Treatment on Protein Content and the Quality of 'Hujingmilu' Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *HortScience*, 50(10), 1531-1536.

Zhu, L., Chen, J., Tang, X. & Xiong, Y. L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2714-2721.

Zhu, H. & Damodaran, S. (1994). Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 846-855.



7.EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Fatma Tuba Pirinç
Doğum Tarihi ve Yeri : 01/09/1990 - Elazığ
E-posta : tuba.pirinc@btu.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2014, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2020, İnönü Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Bölümü

MESLEKİ DENEYİM:

- 2018- , Bursa Teknik Üniversitesi'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir.

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN ÇALIŞMALAR

- **Pirinç, F.T. & Sahingil, D. (2018)**. Identification of bioactive properties (ACE-Inhibition and Antioxidant Activities) of protein-extracts and fractions from white mulberry (*Morus Alba L.*) and leaves. *IV Tibbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu*, İzmir, Türkiye, Ekim 2-4 (özet bildirim).