



Angiotensin Converting Enzyme and Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Activity of Protein Hydrolysates Obtained from Sunflower Meal

Şebnem Şimşek^{1,a,*}

¹Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Ege University, 35040 Bornova/Izmir, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 08/12/2021 Accepted : 05/04/2022</p> <p>Keywords: Sunflower meal ACE inhibitory activity DPP-IV inhibitory activity Protein hydrolysate Enzymatic hydrolysis</p>	<p>In this study, the potential of sunflower protein hydrolysates to inhibit angiotensin converting enzyme (ACE) and dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) enzyme was determined. Sunflower protein isolate was hydrolyzed with Alcalase and Trypsin+Chymotrypsin enzymes and the obtained protein hydrolysates were fractionated by ultrafiltration (<5 kDa and >5 kDa). The degrees of hydrolysis achieved by Alcalase and Trypsin+Chymotrypsin enzymes were 27% and 13%, respectively. The most potent ACE inhibitory activity ($IC_{50}=0.06 \pm 0.01$ mg/mL) was observed for the fraction that has molecular weight below 5 kDa, which was hydrolyzed by Trypsin+Chymotrypsin enzyme ($P<0.05$). The most potent DPP-IV inhibitory activity ($IC_{50}=0.30 \pm 0.05$ mg/mL) was obtained for the fraction that has molecular weight below 5 kDa with no significant difference between the enzymes used. The results of the study showed that sunflower meal protein is a potential source of bioactive peptide and the produced hydrolysates can be used as an alternative ingredient for functional food production.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 10(5): 918-924, 2022

Ayçiçek Küspesinden Elde Edilen Protein Hidrolizatlarının Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim ve Dipeptidil Peptidaz-IV İnhibisyon Aktiviteleri

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 08/12/2021 Kabul : 05/04/2022</p> <p>Anahtar Kelimeler: Ayçiçek küspesi ADE inhibisyon aktivitesi DPP-IV inhibisyon aktivitesi Protein hidrolizati Enzimatik hidroliz</p>	<p>Bu çalışmada ayçiçek protein hidrolizatlarının anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) ve dipeptidil peptidaz-IV (DPP-IV) enzimini inhibe edebilme potansiyeli saptanmıştır. Ayçiçek protein izolatu Alkalaz ve Tripsin+Kimotripsin enzimleri ile hidrolizlenmiş ve elde edilen protein hidrolizatları ultrafiltrasyon ile fraksiyonlanmıştır (<5 kDa ve >5 kDa). Alkalaz ve Tripsin+Kimotripsin enzimleri ile ulaşılan hidroliz dereceleri sırasıyla %27 ve %13 olmuştur. En yüksek ADE inhibisyon aktivitesi ($IC_{50}=0,06 \pm 0,01$ mg/mL) Tripsin+Kimotripsin enzimi ile hidrolizlenen ve molekül ağırlığı 5 kDa'dan düşük olan fraksiyonda gözlenmiştir ($P<0,05$). En yüksek DPP-IV inhibisyon aktivitesi ($IC_{50}=0,30 \pm 0,05$ mg/mL) de molekül ağırlığı 5 kDa'dan düşük olan fraksiyonda saptanmış olup kullanılan enzimler açısından belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Çalışmanın sonuçları ayçiçek küspesinden elde edilen proteinin biyoaktif peptid açısından potansiyel bir kaynak olduğunu ve üretilen hidrolizatların fonksiyonel gıda üretiminde alternatif bir bileşen olarak kullanılabileceğini göstermiştir.</p>

^a sebnem.simsek@ege.edu.tr

<http://orcid.org/0000-0002-8964-8721>



Giriş

Son yıllarda beslenme biliminde yapılan çalışmalar, gıdalardaki protein ve peptitlerin besleyici özelliklerinin yanı sıra insan vücudunda hormon benzeri bazı biyolojik aktiviteler (opioid, ADE inhibitörü, bağışıklık sistemini düzenleyici, mineral bağlayıcı, sitomodülatör, antidiyabetik, hipokolesterolemik ve antiinflamatuvar etki) sergilediklerini ortaya koymuştur. Peptitlerin bu biyoaktivitesi, proteini oluşturan amino asit kompozisyonuna ve bu amino asitlerin dizilişine göre değişkenlik göstermektedir (Korhonen ve Pihlanto, 2006).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE, peptidil dipeptidaz), insan fizyolojisinde önemli bir düzenleyici olan Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sisteminde yer almakta; kan basıncını, hacmini ve elektrolitleri kontrol etmektedir (Keidar ve ark., 2007). Anjiyotensin prosesi, anjiyotensinojenin renin ile hidroliziyle inaktif bir peptit olan Anjiyotensin I oluşumuyla başlamakta ve ADE etkisiyle Anjiyotensin I' in Anjiyotensin II'ye dönüşümü ile sonuçlanmaktadır. Bir oktapeptit olan Anjiyotensin II potansiyel bir damar daraltıcıdır ve bu etkinin yanı sıra ADE, damar rahatlatıcı aktivite gösteren bradikininin de inaktivasyonunu katalizlemektedir. Böylece iki farklı mekanizma yoluyla ADE, kan basıncının artmasına neden olmaktadır (Akıllıoğlu ve Karakaya, 2009). Hipertansiyon tedavisinde ADE inhibisyonu faydalı bir tedavi yaklaşımı olarak kabul edilmiş ve antihipertansif ilaçların geliştirilmesinde hedef olarak belirlenmiştir (Lia ve ark., 2004). Sentetik ADE inhibitörleri antihipertansif ilaç olarak yaygın olarak kullanılmakla birlikte bildirilen bazı yan etkiler nedeniyle son zamanlarda dikkatler doğal bir alternatif veya tamamlayıcı olarak gıda kaynaklı biyoaktif peptitlere odaklanmıştır (Liu ve ark., 2018).

Tip 2 diyabet Dünya genelinde hızla artış gösteren ve kandaki glikoz seviyesinin yüksekliği (hiperglisemi) ile karakterize bir sağlık problemidir. Oluşan kronik hiperglisemi; obezite, hipertansiyon, yüksek kolesterol, kardiyovasküler hastalıklar ve böbrek rahatsızlıkları gibi pek çok komplikasyonla da ilişkilidir. DPP-IV enzimi, metabolik bir serin peptidaz olup insan dokularının hemen hemen hepsinde bulunmaktadır. Bu enzim, inkretin hormonlarından olan ve glikoz varlığında beta hücrelerinden insülin hormonunun salınımının düzenlenmesinden sorumlu glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) ve glukoz-bağımlı insülinotropik peptit (GIP)'in parçalanması ve inaktivasyonuna neden olmaktadır. DPP-IV inhibitörlerinin GLP-1 ve GIP'yi enzimatik hidrolizden koruduğu ve in vivo koşullarda yarı ömürlerinde bir artış sağladığı rapor edilmiştir (Nongonierma ve FitzGerald, 2014; Han ve ark., 2019). Son yıllarda yapılan çalışmalar başta süt proteini fraksiyonları olmak üzere bazı bitkisel protein hidrolizatlarının insanlarda serum glikoz seviyelerinin düzenlenmesinde yarar sağladığını göstermiştir (Nongonierma ve FitzGerald, 2014; González-Montoya ve ark., 2018).

Yapılan çalışmalarda biyoaktif peptit potansiyeli açısından en çok incelenen ürünler süt ve fermente süt ürünleridir (Korhonen ve Pihlanto, 2006; Guha ve ark., 2021). Günümüzde insan nüfusundaki artış ve buna paralel olarak gıda kaynaklarındaki düşüş, ekonomik problemler ve vejetaryen beslenme trendindeki artış sebebiyle bitkisel

kaynaklı proteinlere olan ilgi artış göstermiştir. Son yıllarda özellikle yağsız küspeler de protein kaynağı olarak araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Aydemir ve ark., 2014). Dünyada önemli yağlık bitkilerden birisi olan ayçiçeği Türkiye'de de en fazla ekim alanına ve üretime sahip yağ bitkisidir (Ayçiçeği Bülteni, 2019). Ayçiçek yağ sanayisinin en önemli yan ürünü; protein, mineraller, lif ve polifenollerce zengin küspedir. Yağ ekstraksiyonunda kullanılan tekniğe bağlı olarak değişmekle birlikte yağı alınmış ayçiçek küspesinin içeriğinde kuru bazda %27-63 protein bulunduğu rapor edilmiştir (Wildermuth ve ark., 2016). Ayçiçek küspesi; yüksek protein içeriği, proteininin yüksek sindirilirliği ve önemli zorunlu aminoasitleri (lisin ve sülfür içeren aminoasitler hariç) içermesi açısından hayvan yemi olarak önemli bir kaynak oluşturmaktadır (Salgado ve ark., 2011).

Yukarıda belirtilen gerekçelerden yola çıkarak bu çalışmada bitkisel yağ sanayisinin yan ürünü olan ve yüksek protein içeriği nedeni ile hayvan yemi olarak değerlendirilen ayçiçek küspesinin biyoaktif peptit oluşturma potansiyelinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla küspeden izole edilen proteine kontrollü şartlarda ve farklı özellikte proteolitik enzimler ile hidroliz uygulanmış ve ultrafiltrasyon ile elde edilen 5 kDa altında ve üstündeki peptit fraksiyonlarının potansiyel antidiyabetik aktivitesi ve antihipertansif aktivitesi *in vitro* yöntemle saptanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çalışmada kullanılan ayçiçek küspesi Yonca Gıda Sanayi A.Ş. (Manisa) tarafından sağlanmıştır. Küspeler öğütülmüş ve analizlere kadar cam kavanozlarda oda sıcaklığında saklanmıştır. Çalışmada kullanılmış olan kimyasal malzemelerden Alkalaz 2.5L enzimi Novozyme firması tarafından sağlanmıştır. Tripsin (T0303), Kimotripsin (C7762), Anjiyotensin dönüştürücü enzim (A6778, 0.25 UN) ve FAPGG (F7131) Sigma-Aldrich (Almanya); Vivaspin20 ultrafiltrasyon tüpleri (5 kDa) Sartorius Stedim Biotech (Almanya), DPP-IV enzim kiti (BML-AK499) Enzo Life Sciences (İsviçre), Pierce Bikononik asit (BCA) protein analiz kiti ise Thermo Fisher Scientific (Amerika Birleşik Devletleri) firmasından satın alınmıştır. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Yöntem

Protein izolasyonu

Ayçiçek küspesinden protein izolasyonu gerçekleştirilmeden önce küspede bulunan fenolik bileşenlerin uzaklaştırılması amacıyla bazı ön işlemler uygulanmıştır. Bu amaçla küspe 1:5 (a/a) oranında su ile manyetik karıştırıcıda 20 dak karıştırılmış, dört kat tülbentten süzülüş ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Üçüncü aşamada tülbentten kalan katı %10 etanol ile 20 dak karıştırılmış ve dört kat tülbentten süzülüşü. Yıkamış küspe 50°C'de kurutulmuş ve analizlere kadar oda sıcaklığında depolanmıştır.

Küspeden protein izolasyonu Villanueva ve ark. (1999a) tarafından verilen yöntem modifiye edilerek

gerçekleştirilmiştir. Küşpe 1:12,5 oranında su ile karıştırılmış ve pH 9'a ayarlanarak 30 dak alkali ekstraksiyon yapılmıştır. Alkali ekstraksiyonu sırasında fenolik maddelerin oksidasyonunu engellemek amacıyla ortama %0,1 oranında Na₂SO₃ eklenmiştir. İki kez tekrar edilen ekstraksiyon sonrası, santrifüj (10000 ×g, 10 dak) ile toplanan süpernatantlar birleştirilmiş ve pH'sı ayçiçek proteini için izoelektrik pH olan 4,3'e ayarlanmıştır. 30 dak'lık izoelektrik çöktürme sonrasında santrifüj uygulanarak süpernatant uzaklaştırılmıştır. Çöken proteinler 3 kez safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla su ile çözülüp tekrar santrifüjlenmiş ve üstteki çözünür kısım uzaklaştırılmıştır. Elde edilen protein izolatu az miktarda suda çözülerek pH'sı 7,0'ye ayarlanmış ve liyofilize edilmiştir. Liyofilize protein izolatu analizlere kadar -18°C'de depolanmıştır.

Ayçiçek protein izolatının enzimatik hidrolizi

Protein hidrolizinde Alkalaz 2,5L ve Tripsin+Kimotripsin enzimleri kullanılmıştır. Enzimler, enzim:substrat oranı 1:10 (a/a) olarak eklenmiştir. Hidroliz süresince (150 dak) pH'nın enzimin optimum değeri olan 8,0'de tutulabilmesi için pH-stat cihazı (Kyoto Kem AT 510, Japonya) kullanılmış ve işlem Alkalaz ve Tripsin+Kimotripsin enzimleri için sırasıyla optimum sıcaklık olan 50°C ve 40°C'de gerçekleştirilmiştir. Hidroliz süresi sonunda enzimin inhibisyonunu sağlamak için karışım 100°C'de 10 dak inkübe edilmiştir. Hidrolizatlar, biyoaktif peptit özelliği gösterebilmek potansiyelini değerlendirebilmek amacıyla ultrafiltrasyon membranı (5 kDa) içeren özel santrifüj tüpleri ile fraksiyonlanmıştır. Molekül ağırlığı 5 kDa'un altındaki ve üstündeki fraksiyonlar sonraki analizler için liyofilize edilmiş ve -18°C'de depolanmıştır.

pH-stat cihazındaki NaOH sarfiyatlarından yola çıkarak örneklerin hidroliz derecesi (HD) Adler-Nissen ve ark. (1983) tarafından önerilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$HD = V \times N \times (1/\alpha) \times (1/M) \times (1/h_{\text{tot}}) \times 100\%$$

V : Kullanılan baz hacmi (L),

N : Bazın normalitesi,

1/α : α-NH₂ grubunun ortalama salınım derecesi,

M : Örnekteki protein miktarı (kg),

h_{tot} : Protein örneğindeki toplam peptit bağı sayısı, 1/α = 1,13 (50°C, pH 8), h_{tot} = 7,8 mev/g protein (soya proteini ve diğer yağlı tohum proteinleri için)

Toplam Protein Tayini

Küşpenin ve protein izolatlarının protein miktarı Dumas yöntemi (Faktör: 6,25), protein hidrolizatlarındaki çözünür protein içeriği ise Bikikoninik asit analiz kiti kullanılarak belirlenmiştir.

Protein izolatu ve hidrolizatlarının jel elektroforezi ile görüntülenmesi

Elektroforez analizinde hazır formdaki Bio-Rad Mini Protean® TGX™ %12'lik jel kullanılmıştır. Analizi yapılacak olan örnekler 1:5 oranında örnek tamponuyla (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, %2 SDS, %25 (v/v) gliserol, %0,01 bromfenol mavisi, %5 β-merkaptotanol) karıştırılmış, 95 °C'de 5 dak inkübe edilmiş ve elektroforez 100 V sabit voltajda gerçekleştirilmiştir. İşlem sonunda jel çıkartılarak Coomassie ile boyanmış ve fazla boyanın uzaklaştırılmasından sonra jel görüntüsü alınmıştır.

ADE inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi

Örneklerin ADE inhibisyon aktivitesinin belirlenmesinde Shalaby ve ark. (2006) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Yönteme göre 10 µL ADE enzimi (0,125 Unit/mL, 0,01 M fosfat tamponu, 0,5 M NaCl, pH 7,0), 10 µL farklı konsantrasyonlardaki örneklerle karıştırılmış ve 10 dak 37°C'de inkübe edilmiştir. Bu karışıma 150 µL 1,0 mM FAPGG substrat çözeltisi eklenmiş ve absorbandsdaki azalma mikropilaka okuyucuda (Thermo Scientific Varioskan Flash spektrofotometre, Amerika Birleşik Devletleri) 30 dakika boyunca (37°C, 340 nm) ölçülmüştür. Absorbans değişiminin zamana karşı çizilen grafiğindeki eğimler kullanılarak örneklerin inhibisyon aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ ADE inhibisyonu} = \left[1 - \frac{\text{PHE}}{\text{KE}} \right] \times 100$$

PHE : Protein hidrolizatı varlığındaki eğim

KE : Kontrolün eğimi

Örneklerin IC₅₀ değeri (enzimin %50'sini inhibe eden protein konsantrasyonu), % ADE inhibisyonuna karşılık gelen mg protein miktarına bağlı olarak çizilen grafikten hesaplanmıştır.

DPP-IV inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi

Örneklerin DPP-IV inhibisyon aktivitesi "DPP-IV Drug Discovery" analiz kiti kullanılarak belirlenmiştir. Yönteme göre kit içerisinde yer alan DPP-IV enzimi 17,3 µU/µL olacak şekilde tampon çözelti içerisinde seyreltilmiştir. Mikroplakanın hücrelerine kontrol için 35 µL tampon çözelti, analizi yapılacak örnekler için ise 15 µL tampon ve 20 µL farklı oranlarda seyreltilmiş hidrolizat eklenmiştir. Kontrol ve örnekler üzerine 15 µL DPP-IV enzimi eklenmiş ve inhibitör-enzim reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için 10 dak inkübe edilmiştir (37°C). Reaksiyon 50 µL kromajenik substrat olan H-Gly-Pro-pNA eklenerek başlatılmış ve absorbanstaki değişim 20 dak boyunca 405 nm'de ölçülmüştür. Absorbans değişiminin zamana karşı çizilen grafiğindeki eğimler kullanılarak örneklerin inhibisyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ DPP-IV inhibisyonu} = \left[1 - \frac{\text{PHE}}{\text{KE}} \right] \times 100$$

PHE : Protein hidrolizatı varlığındaki eğim

KE : Kontrolün eğimi

Örneklerin IC₅₀ değeri % DPP-IV inhibisyonuna karşılık gelen mg protein miktarına bağlı olarak çizilen grafikten hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında tüm analizler iki tekrar iki paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin ADE ve DPP-IV inhibitör kapasitelerini ifade eden IC₅₀ değeri GraphPad Prism Version 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego) kullanılarak hesaplanmıştır. Araştırma sonuçlarının analizi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak yapılmış ve P<0,05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Protein İzolatı Eldesi

Çalışma kapsamında kullanılan ayçiçek küspesinin toplam protein içeriği $27,6 \pm 0,51$ olarak belirlenmiştir. Bu değer, Boni ve ark. (1987) ve Filho ve Egea (2021) tarafından yağı uzaklaştırılmış ayçiçek küspesi için verilmiş olan %29 ve %27,8'lik protein içerikleri ile de uyumludur. Yapılan çalışmalarda ayçiçek tohumlarının klorojenik asit ve kafeik asit içermesi nedeniyle proteinin alkali ekstraksiyonu sırasında bu fenoliklerin kinonlara oksidasyonun gerçekleştiği, kahverengi-yeşil polimerik bileşiklere dönüşüm sonucunda ürünün görselliğinin olumsuz etkilendiği, bu nedenle de gıda sanayisindeki kullanımının kısıtlandığı ve daha çok hayvan yemi olarak değerlendirildiği belirtilmiştir (Pickardt ve ark., 2011). Mevcut çalışma kapsamında protein ekstraksiyonu öncesinde uygulanan yıkama işlemleri ile çözünür nitelikteki şekerler ve fenoliklerin büyük bir kısmı ortamdaki uzaklaştırılmış, alkali ekstraksiyonu sırasında sodyum sülfid kullanımı ile de bağlı fenoliklerin oksidasyonu önlenmiştir. Uygulanan alkali ekstraksiyonu, izoelektrik pH'da çöktürme ve liyofilizasyon sonrası protein içeriği $89,9 \pm 0,25$ olan protein izolatu elde edilmiştir.

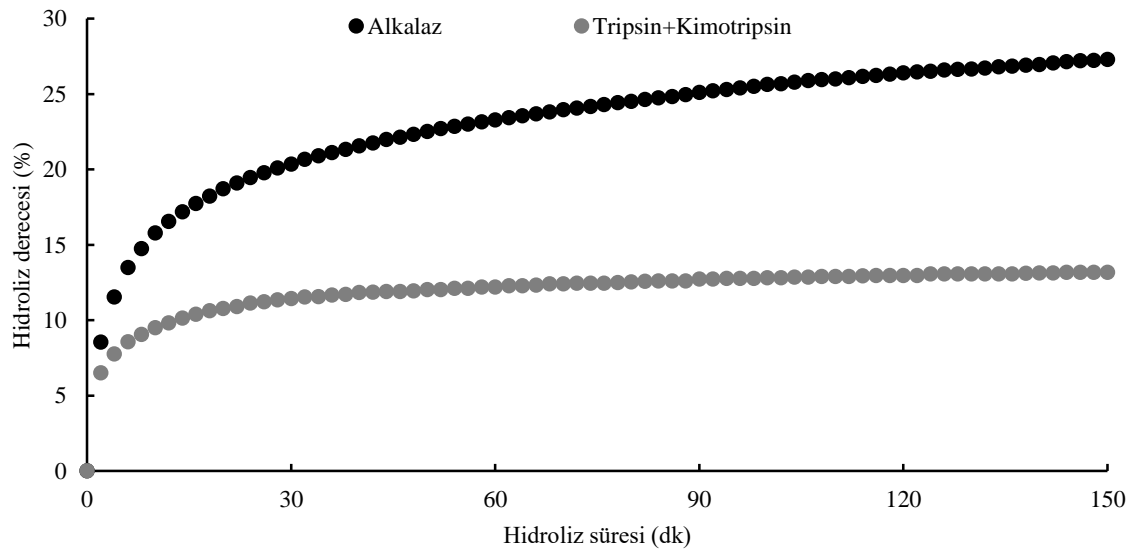
Protein Hidroliz Derecesi

Protein hidroliz derecesi, hidroliz süresince önemli bir belirteç olup ürünün verimi, proteinin geri kazanımı, fonksiyonel özellikleri ve organoleptik kalitesini (acıklık vb.) etkilemektedir (Addler-Nissen, 1986). Ayçiçek küspesinden izole edilen proteinden biyoaktif peptit üretmek amacıyla Alkalaz ve Tripsin+Kimotripsin enzimleri ile kontrollü hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayçiçek protein izolatının her iki enzim için elde edilen zamana bağlı hidroliz eğrisi Şekil 1'de verilmiştir.

Şekil 1'de görüldüğü gibi enzimlerin ayçiçek proteinini hidrolizi ilk 20 dak içerisinde en yüksek düzeyde

gerçekleşmiştir. Bu ilk hızlı hidroliz aşaması peptit bağlarının maksimum düzeydeki hidrolizi hakkında bilgi verirken bu hidroliz derecesinin zaman içerisindeki yavaşlama hızı, substrat ile yarışan bazı bileşenlerin oluşması, hidrolize açık peptit bağı konsantrasyonunda azalma veya enzim inhibisyonundan kaynaklanmaktadır (Ketnawa ve ark., 2017). İlk 20 dak'lık süre sonrasında Alkalaz enzimi ile hidroliz yavaş bir hızla artış göstermeye devam ederken, 20 dak sonrasında Tripsin+Kimotripsin hidroliz hızı maksimum %3 oranında artış göstermiştir. Uygulanan enzimatik hidroliz sonucunda ayçiçek proteini için ulaşılan hidroliz derecesi Alkalaz ve Tripsin+Kimotripsin enzimleri için sırasıyla %27 ve %13 olarak saptanmıştır.

Villanueva ve ark. (1999b) ayçiçek protein izolatının Alkalaz ile 180 dak'lık hidrolizi sonucunda %34,7'lik hidroliz derecesine ulaşmıştır. Megias ve ark. (2007) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ayçiçek protein izolatının Alkalaz ile 60 dak'lık hidrolizi sonucunda yaklaşık %25 hidroliz derecesi elde edilirken sonrasında ortama Flavourzyme enziminin ilavesiyle 180 dak sonunda yaklaşık %70'lik hidroliz derecesine ulaşılmıştır. Han ve ark. (2021) ayçiçek proteininin Alkalaz ve pepsin enzimleri ile 6 saatlik hidrolizi sonunda %18,8 ve %13,3'lük hidroliz derecesine ulaşmıştır. Mevcut çalışmada elde edilen hidroliz derecesi yapılan çalışmalarda Alkalaz enzimi ile elde edilmiş olan hidroliz dereceleri ile benzerlik göstermektedir. Alkalaz, protein hidrolizati eldesinde sıklıkla kullanılan ve endoproteaz özelliği gösteren bir enzimdir (Villanueva ve ark., 1999a). Tripsin ve Kimotripsin enzimleri ise aromatik amino asitlerin (triptofan, tirozin ve fenilalanin) C-terminalinde ve sırasıyla arginin ve lizin kalıntılarının C-terminalindeki peptit bağlarını hidrolize eden alkalik endoproteazlar olmaları nedeniyle daha spesifikler (Adjonu ve ark., 2013).



Şekil 1. Ayçiçek protein izolatının Alkalaz ve Tripsin+Kimotripsin enzimleri ile hidroliz derecesi (%)
Figure 1. Degree of hydrolysis (%) of sunflower meal protein isolate catalysed by Alkalase and Trypsin+Chymotrypsin

Çalışma kapsamında Tripsin+Kimotripsin enzimleri ile ulaşılan hidroliz derecesinin düşük olmasında bu spesifikliğin etkili olabileceği düşünülmektedir. Megias ve ark. (2004) yaptıkları bir çalışmada ayçiçek protein izolatında ilk 180 dak pepsin ve sonrasında 180 dak pankreatin enzimiyle hidroliz sonucunda yaklaşık %37'lik bir hidroliz derecesine ulaşmıştır. Pankreatin enzimi tripsin, kimotripsin ve elastaz gibi enzimleri içermekte olup, öncesinde uygulanan pepsin hidrolizinin daha yüksek hidroliz derecesine ulaşmada katkısı olduğu görülmektedir.

Protein Elektroforezi

SDS-PAGE analizi ayçiçek protein izolatının kompozisyonu ve uygulanan enzimatik hidroliz işlemlerinin protein kompozisyonu üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ayçiçek protein izolatı ve hidrolizatlarına ait elektroforez görüntüsü Şekil 2'de verilmiştir. Ayçiçek proteinlerinin çoğunluğunu globülinler oluşturmaktadır (Perez, 2003). Protein izolatının indirgenmiş formdaki görüntüsünde (1) yer alan daha küçük boyutlu peptitler (9-17 kDa) 2S albümin, 20-50 kDa arasındaki protein grubu ise heliantinin olarak adlandırılan 11S globülinleri ile ilişkilendirilebilir (Perez, 2003; Karefyllakis ve ark., 2017).

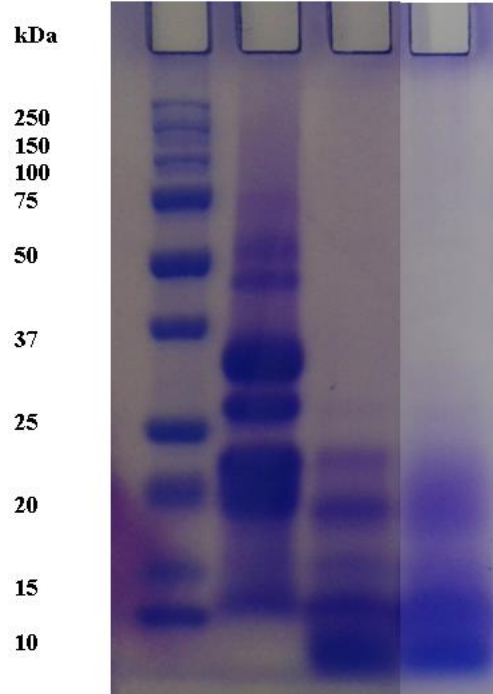
Hidrolizatlarda izolata kıyasla gözlenen en belirgin değişiklik proteinlerin molekül ağırlığında görülen azalmadır. Alkalaz ve Tripsin+Kimotripsin ile elde edilen hidrolizatlarda benzer protein profilleri elde edilmiştir. Her iki hidrolizatta da temel olarak 23 kDa ve daha düşük molekül ağırlığına sahip polipeptitler ve peptitler yer almaktadır. Çalışmayı destekler şekilde ayçiçek protein hidrolizatlarında gerçekleştirilen farklı çalışmalarda %12'nin üzerindeki hidroliz değerlerinde temel olarak düşük molekül ağırlıklı proteinler ve peptitlerin oluştuğu belirtilmiştir (Parrado ve ark., 1993, Cai ve ark., 1996, Villanueva ve ark., 1999b, Megias ve ark., 2004).

Protein Hidrolizatlarının Antihipertansif Etkisi

Örneklerin potansiyel antihipertansif etkisi *in vitro* koşullarda ADE enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri göz önüne alınarak belirlenmiştir. Protein hidrolizatlarının artan konsantrasyonları ADE enzimi üzerinde artan şekilde inhibisyon etkisi göstermiştir. Elde edilen fraksiyonların IC₅₀ değerlerine bakıldığında 0,06-0,14 mg protein/mL arasında değiştiği saptanmıştır (Çizelge 1). Tüm fraksiyonların oldukça yüksek ADE inhibisyonu aktivitesine sahip olduğu saptanmakla birlikte en yüksek ADE inhibisyonu Tripsin+Kimotripsin enzimi ile hidrolizlenen ve 5 kDa molekül ağırlığından düşük olan fraksiyonda belirlenmiştir (P<0,05). 5 kDa üzerindeki fraksiyonda Alkalaz ve Tripsin+Kimotripsin enzimleri ile hidrolizin belirgin bir etkisi gözlemlenmezken, 5 kDa altındaki fraksiyonda Tripsin+Kimotripsin hidrolizatı Alkalaz hidrolizatından yaklaşık iki kat fazla ADE inhibisyon aktivitesi göstermiştir.

Megias ve ark. (2004) ayçiçek proteininde üç saat pepsin ve takip eden üç saat pankreatin hidrolizi ile maksimum %37'lik bir hidroliz derecesine ulaşmış, en yüksek ADE inhibisyonun (%45) ise ~%10 hidroliz derecesine ulaşılan ilk 15 dak'lık zaman diliminde elde edildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar ADE inhibisyon aktivitesinde hidroliz derecesine bağlı gerçekleşen

dalgalanmaların, inhibitör aktivite gösteren peptitlerin hidroliz sürecindeki oluşum/yıkım döngüsünden kaynaklanabileceği sonucuna varmışlardır. Aynı çalışmada ayçiçek protein hidrolizatına uygulanan kromatografik işlemlerle FVNPQAGS dizisine sahip ADE inhibitör peptit saflaştırılmıştır. Benzer şekilde ayçiçek protein izolatının 60 dak Alkalaz ve 120 dak Flavourzyme ile hidrolizi sonucu %70'e yakın bir hidroliz derecesine ulaşıldığı bir çalışmada en yüksek ADE inhibisyonu (%56) yaklaşık %23'lük hidroliz derecesinde elde edilmiştir. Afinite kromatografisi ile yapılmış olan saflaştırma sonucunda IC₅₀ değeri 0,08-0,09 µg/mL olan fraksiyonlar saptanmıştır (Megias ve ark., 2009). Her iki çalışmada da hidrolizatların toplam ADE inhibisyonu raporlanmamıştır. Mevcut çalışmada elde edilmiş olan ADE inhibisyon aktivitesi, farklı proteazlarla hidrolize edilmiş kanola proteini (IC₅₀= 8,1-36,0 µg protein/mL) ve kolza tohumu proteini (IC₅₀=0,02-0,07 mg protein/mL) için elde edilen değerlerden düşük, yeşil soya hidrolizatı (IC₅₀=0,14-1,14 mg protein/mL) için elde edilen değerlerle benzer etki göstermiştir (Wu ve ark., 2009, Ma'kinen ve ark., 2012, Hanafi ve ark., 2018). Çalışma sonucunu destekler şekilde Han ve ark. (2021)'nin Alkalaz ve pepsin ile hidrolize edilmiş yağlı tohum proteinlerini (keten tohumu, kolza, ayçiçek, susam, soya) kontrol olarak kazein ve peyniraltı suyu proteinleri ile kıyasladığı bir çalışmada, Alkalaz ile hidrolizlenen örneklerde kolza tohumu hidrolizatından sonra en yüksek ikinci ADE inhibisyonunun ayçiçek protein hidrolizatında saptandığı bildirilmiştir. Çalışma sonucunda yağlı tohum proteinlerinin süt proteinleri ile kıyaslandığında ADE inhibisyonu açısından potansiyel bir kaynak olabileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 2. Ayçiçek protein izolatı ve hidrolizatlarına ait elektroforez görüntüsü

(1: Ayçiçek protein izolatı, 2: Alkalaz hidrolizatı, 3: Tripsin+Kimotripsin hidrolizatı)

Figure 2. SDS-PAGE profile of sunflower meal isolate and their corresponding hydrolysates

(1: Sunflower protein isolate, 2: Alcalase hydrolysate, 3: Trypsin+Chymotrypsin hydrolysate)

Çizelge 1. Ayçiçek protein hidrolizatı fraksiyonlarının ADE ve DPP-IV enzim inhibisyon aktivitesi
Table 1. ACE and DPP-IV inhibitory activity of sunflower protein hydrolysate fractions

Enzim İnhibisyon Aktivitesi (IC ₅₀ , mg protein/mL)*		
	ADE	DPP-IV
<5 kDa		
Alkalaz	0.14 ± 0.01 ^c	0.30 ± 0.05 ^a
Tripsin+Kimotripsin	0.06 ± 0.00 ^a	0.36 ± 0.07 ^a
>5 kDa		
Alkalaz	0.09 ± 0.01 ^b	0.84 ± 0.01 ^b
Tripsin+Kimotripsin	0.11 ± 0.01 ^b	1.64 ± 0.24 ^c

*Bir sütunda farklı harflerle işaretlenmiş değerler istatistiksel açıdan önemli olacak düzeyde birbirinden farklıdır (P<0,05, Tukey test).

Protein Hidrolizatlarının Antidiyabetik Etkisi

Protein hidrolizatlarının potansiyel antidiyabetik etkisi *in vitro* koşullarda DPP-IV enzimini inhibe edebilme potansiyelleri açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen fraksiyonların IC₅₀ değerleri 0,30-1,64 mg protein/mL arasında değişmektedir. Sonuçlara bakıldığında en yüksek DPP-IV inhibisyonu molekül ağırlığı 5 kDa altında olan fraksiyonlarda belirlenmiş olup Alkalaz ve Tripsin+Kimotripsin enzim uygulamaları arasında istatistiksel olarak belirgin bir farklılık saptanmamıştır (P>0,05). Bu fraksiyonlarda molekül ağırlığı 5 kDa üzerinde olan fraksiyonlarla kıyaslandığında Alkalaz ve Tripsin+Kimotripsin enzim uygulamaları için sırasıyla 2,8 kat ve 4,5 kat daha yüksek DPP-IV inhibisyonu saptanmıştır. Molekül ağırlığı 5 kDa üzerinde olan fraksiyonlarda ise Alkalaz ve Tripsin+Kimotripsin enzim uygulamaları arasında istatistiksel olarak belirgin bir farklılık saptanmıştır (P<0,05).

Yapılan çalışmalar süt proteini hidrolizatlarının iyi bir DPP-IV inhibitör peptit kaynağı olduğunu göstermiştir (Nongonierma ve FitzGerald, 2014). Son yıllarda özellikle bitkisel protein kaynaklarının da potansiyel etkileri araştırılmaktadır. Farklı bitkisel protein hidrolizatlarının (soya, yulaf, bezelye, acı bakla, mercimek, nohut ve patates) DPP-IV inhibisyonlarının değerlendirildiği bir çalışmada en yüksek inhibisyon potansiyeli 3-0,8 kDa molekül ağırlığına sahip soya proteininde (IC₅₀=1,16 mg/mL) tespit edilmiştir (Rivero-Pino ve ark., 2021). Han ve ark. (2019) tarafından yapılan *in silico* değerlendirmede yağlı tohum proteinlerinin DPP-IV inhibitör etkisine sahip peptitler için iyi bir kaynak olabileceği belirtilmiştir. Ancak, aynı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen *in vitro* çalışmada *in silico* çalışmanın aksine 10 mg/ml protein konsantrasyonlarında ulaşılabilen DPP-IV inhibisyonu %50'nin altında kalmıştır (Han ve ark., 2021). Mevcut çalışmada ayçiçek protein hidrolizatları için elde edilen DPP-IV inhibisyon aktivitesi bitkisel protein hidrolizatlarına göre yüksek olup, buğday gluten hidrolizatı için elde edilen IC₅₀= 0,24-0,66 mg/mL inhibisyon konsantrasyonu ile benzerlik göstermiştir (Nongonierma ve ark., 2017).

Sonuç

Bu çalışmada Alkalaz ve Tripsin+Kimotripsin enzimlerinin kullanımı ile ayçiçek protein hidrolizatları hazırlanmış ve fraksiyonlanmıştır. Yüksek hidrolizat verimi ve elde edilen jel görüntüleri, uygulanan enzimatik hidroliz

işleminin ayçiçek protein izolatının hidrolizini etkili bir şekilde gerçekleştirdiğini göstermiştir. Çalışmada en yüksek ADE inhibisyonu molekül ağırlığı 5 kDa altındaki fraksiyonda Tripsin+Kimotripsin hidrolizatı için gözlenmiştir. DPP-IV inhibisyonu da molekül ağırlığı 5 kDa altındaki fraksiyonda yüksek oranda saptanmış olup hidrolizde kullanılan enzimlerin belirgin bir etkisi saptanmamıştır. Çalışmada elde edilmiş olan sonuçlar, ayçiçek küspesinden izole edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi ile ADE inhibisyon aktivitesi ve DPP-IV inhibisyon aktivitesine sahip biyoaktif peptitlerin oluşturulabileceğini göstermiştir. Yüksek biyoaktiviteleriyle ilişkili olarak ayçiçek protein hidrolizatları, sağlıklı bireylerin yanı sıra yüksek tansiyon ve diyabet gibi hastalıklara sahip bireyleri destekleyici yönde yeni fonksiyonel ürünler geliştirilmesinde kullanılabilir. Bu kapsamda ilerleyen çalışmalarda yüksek inhibisyon aktivitesi gösteren peptitlerin saflaştırılmaları, karakterizasyonu ve *in vivo* koşullardaki aktivitelerinin belirlenmesi uygun olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma "Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü" tarafından 15MÜH065 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Adler-Nissen J, Eriksen S, Olsen HS. 1983. Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. *Plant Foods for Human Nutrition*, 32: 411-423. <https://doi.org/10.1007/BF01091198>.
- Adjonu R, Doran G, Torley P, Agboola S. 2013. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. *Food Chemistry*, 136: 1435-1443. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.053>.
- Akillioglu G, Karakaya S. 2009. Effects of heat treatment and *in vitro* digestion on the Anjiyotensin converting enzyme inhibitory activity of some legume species. *European Food Research and Technology*, 229(6): 915-921. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1133-x>.
- Aydemir LY, Gökbulut AA, Baran Y, Yemencioğlu A. 2014. Bioactive, functional and edible film-forming properties of isolated hazelnut (*Corylus avellana* L.) meal proteins. *Food Hydrocolloid*, 36: 130-142. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.014>.
- Ayçiçeği Bülteni, 2019. <https://www.tarimorman.gov.tr/BUGEM/Belgeler/MILLI%20TARIM/AYCIÇEĞI%20KASIM%20BULTENI.pdf>. [Erişim 19.11.2021]
- Boni R, Assogna A, Grillo F, Robertello A, Petrucci F, Giacomozzi E, Patricelli A. 1987. Method for preparing protein hydrolysates soluble in an acid environment, and the hydrolysates obtained. *European Patent* EPO 271 964 A2.
- Cai T, Chang K, Lunde H. 1996. Physicochemical properties and yields of sunflower protein enzymatic hydrolysates as affected by enzyme and defatted sunflower meal. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44: 3500-3506. <https://doi.org/10.1021/jf9507396>.
- Filho JGO, Egea MB. 2021. Sunflower seed byproduct and its fractions for food application: An attempt to improve the sustainability of the oil process. *Journal of Food Science*, 86: 1497-1510. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15719>.
- González-Montoya M, Hernández-Ledesma B, Mora-Escobedo R, Martínez-Villaluenga AC. 2018. Bioactive peptides from germinated soybean with anti-diabetic potential by inhibition of dipeptidyl peptidase-IV, α -amylase, and α -glucosidase enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 2883-2897. <https://doi.org/10.3390/ijms19102883>.

- Guha S, Sharma H, Deshwal GK, Rao PS. 2021. A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species. *Food Production, Processing and Nutrition*, 3(2): 2-21. <https://doi.org/10.1186/s43014-020-00045-7>.
- Han R, Maycock J, Murray BS, Boesch C. 2019. Identification of anjyotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides derived from oilseed proteins using two integrated bioinformatic approaches. *Food Research International*, 115: 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.015>.
- Han R, Alvarez AJH, Maycock J, Murray BS, Boesch C. 2021. Comparison of alcalase- and pepsin-treated oilseed protein hydrolysates –Experimental validation of predicted antioxidant, antihypertensive and antidiabetic properties. *Current Research in Food Science*, 4: 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2021.03.001>
- Hanafi MA, Hashim SN, Shyan Yea C, Ebrahimpour A, Zarei M, Muhammad K, Abdul-Hamid A, Saari N. 2018. High anjyotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Alcalase-digested green soybean (*Glycine max*) hydrolysates. *Food Research International*, 106: 589-597. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.030>.
- Karefyllakis D, Altunkaya S, Berton-Carabin CC, van der Goot AJ, Nikiforidis CV. 2017. Physical bonding between sunflower proteins and phenols: Impact on interfacial properties. *Food Hydrocolloids*, 73: 326-334. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.018>
- Keidar, S., Kaplan, M. and Gamliel-Lazarovich, A. 2007. ACE2 of the heart: From anjyotensin I to anjyotensin (1–7). *Cardiovascular Reserach*, 73: 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.09.006>.
- Ketnawa S, Benjakul S, Martinez-Alvarez O, Rawdkuen S. 2017. Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability. *Food Chemistry*, 215: 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.145>.
- Korhonen H, Pihlanto A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16: 945-960. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>.
- Lia G-H, Lea G-W, Shia Y-H, Shrestha S. 2004. Anjyotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, 24: 469–486. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2003.10.014>.
- Liu C, Fang L, Min W, Liu J, Li H. 2018. Exploration of the molecular interactions between anjyotensin-I-converting enzyme (ACE) and the inhibitory peptides derived from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.). *Food Chemistry*, 245, 471–480. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.095>.
- Ma'kinen S, Johansson T, Gerd EV, Pihlavan JM, Pihlanto A. 2012. Anjyotensin I- onverting enzyme inhibitory and antioxidant properties of rapeseed hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 4: 575-583. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.03.003>
- Megias C, Yust MM, Pedroche J, Lquari H, Giron-Calle J, Alaiz M, Millaan F, Vioque J. 2004. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 1928-1932. <https://doi.org/10.1021/jf034707r>.
- Megias C, Pedroche J, Yust MM, Giroan-Calle JG, Alaiz M, Millaan F, Vioque J. 2007. Affinity purification of copper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55: 6509–6514. <https://doi.org/10.1021/jf0712705>.
- Megias C, Pedroche J, Yust MM, Alaiz M, Giro'n-Calle J, Milla'n F, Vioque J. 2009. Purification of anjyotensin converting enzyme inhibitory peptides from sunflower protein hydrolysates by reverse-phase chromatography following affinity purification. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 228–232. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.05.003>.
- Nongonierma AB, FitzGerald RJ. 2014. An in silico model to predict the potential of dietary proteins as sources of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Food Chemistry*, 165: 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.090>.
- Nongonierma AB, Hennemann M, Paoletta S, FitzGerald RJ. 2017. Generation of wheat gluten hydrolysates with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory properties. *Food & Function*. 8(6): 2249-2257. <https://doi.org/10.1039/c7fo00165g>.
- Parrado J, Millan F, Hernandez Pinzon I, Bautista J, Machado A. 1993. Characterization of enzymatic sunflower protein hydrolysates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41: 1821-1825. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0184-2>
- Pérez SG. 2003. Physico-chemical and functional properties of sunflower proteins. Ph.D. Dissertation, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Pickardt C, Weisz GM, Eisner P, Kammerer DR, Neidhart S, Carle RR. 2011. Processing of low polyphenol protein isolates from residues of sunflower seed oil production. *Procedia Food Science*, 1: 1417-1424. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.210>.
- Rivero-Pino F, Espejo-Carpio J, Guadix EM. 2021. Identification of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from vegetable protein sources. *Food Chmeistry*, 354: 129473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129473>.
- Salgado PR, Ortiz SEM, Petruccelli S, Mauri AN. 2011. Sunflower protein concentrates and isolates prepared from oil cakes have high water solubility and antioxidant capacity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88:351-360. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1673-z>.
- Shalaby SM, Zakora M, Otte J. 2006. Performance of two commonly used anjyotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *Journal of Dairy Research*, 73(2): 178-186. <https://doi.org/10.1017/S0022029905001639>.
- Villanueva A, Vioque J, Sánchez-Vioque R, Clemente A, Bautista J, Millán, F. 1999a. Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases. *Grasas y Aceites*, 50: 472-476. <https://doi.org/10.3989/gya.1999.v50.i6.697>.
- Villanueva A, Vioque J, Sánchez-Vioquea R, Clemente A, Pedroche J, Bautista J, Millán F. 1999b. Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76: 1455-1460. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0184-2>.
- Wildermuth SR, Young EE, Were LM. 2016. Chlorogenic acid oxidation and its reaction with sunflower proteins to form green-colored complexes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12: 829-843. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12213>.
- Wu J, Aluko RE, Muir AD. 2009. Production of anjyotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from defatted canola meal. *Bioresource Technology*, 100: 5283–5287. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.090>.