

Araştırma Makalesi

***Morchella esculenta* Protein Hidrolizatlarında Anjiotensin Dönüştürücü Enzim İ'nin Peptid İnhibitörlerinin Araştırılması**

Ali ZEYTÜNLÜOĞLU*

Pamukkale Üniversitesi, Denizli Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, 20160, Denizli

*Sorumlu yazar: azeytun@pau.edu.tr

Geliş Tarihi: 06.09.2019

Düzeltilme Geliş Tarihi: 17.09.2019

Kabul Tarihi: 17.09.2019

Özet

Mantarlar sağlığa yararlı ve birçok dejeneratif hastalığa karşı koruyucu çok sayıda aktif bileşen içermelerinden dolayı alternatif ve tamamlayıcı tıpta terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır. *Morchella esculenta* dünyada yenilebilen en değerli mantar türlerinden biridir. *M. esculenta* mantarı antimikrobiyal, antiinflamatuar, immunostimülatör, antitümör ve antioksidant gibi tıbbi ve farmakolojik özellikler sergileyen çok sayıda tokoferol, karotenoid, organik asit, polisakkarit ve fenolik bileşikler içerir. Bu çalışmada *M. esculenta* mantarının anjiotensin dönüştürücü I (ACE-I) enzimi üzerine inhibitör etkisi incelendi. Mantar ekstraktından alkalaz enzimi hidrolizi sonrası elde edilen peptid fragmanları ultrafiltrasyon membranları kullanılarak fraksiyonlandı. Elde edilen fraksiyonların anjiotensin dönüştürücü I (ACE-I) enzimi üzerine inhibitör etkisi *in vitro* koşullarda çalışıldı. Fraksiyonlar içerisinde en yüksek ACE-I inhibisyonu % 94 ile 5kDa<peptidler<10 kDa arasındaki peptidleri içeren fraksiyonda gözlemlendi. Bu fraksiyonun ACE-I için IC₅₀ değeri 4,2 µg/ml olarak hesaplandı. Fraksiyondaki peptid sayısı ve saflığı % 12 SDS-PAGE jel ile belirlendi. Çalışma sonuçları göstermektedir ki *M. esculenta* mantarı hipertansiyon hastalığının önlenmesi ve tedavisinde kullanılabilecek fonksiyonel peptid türevli gıda bileşenlerine sahiptir.

Anahtar kelimeler: Anjiotensin dönüştürücü enzim-I, hipertansiyon, protein hidrolizat, ultrafiltrasyon, enzim inhibisyonu.

Investigation of Peptide Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme-I in *Morchella esculenta* Protein Hydrolysates

Abstract

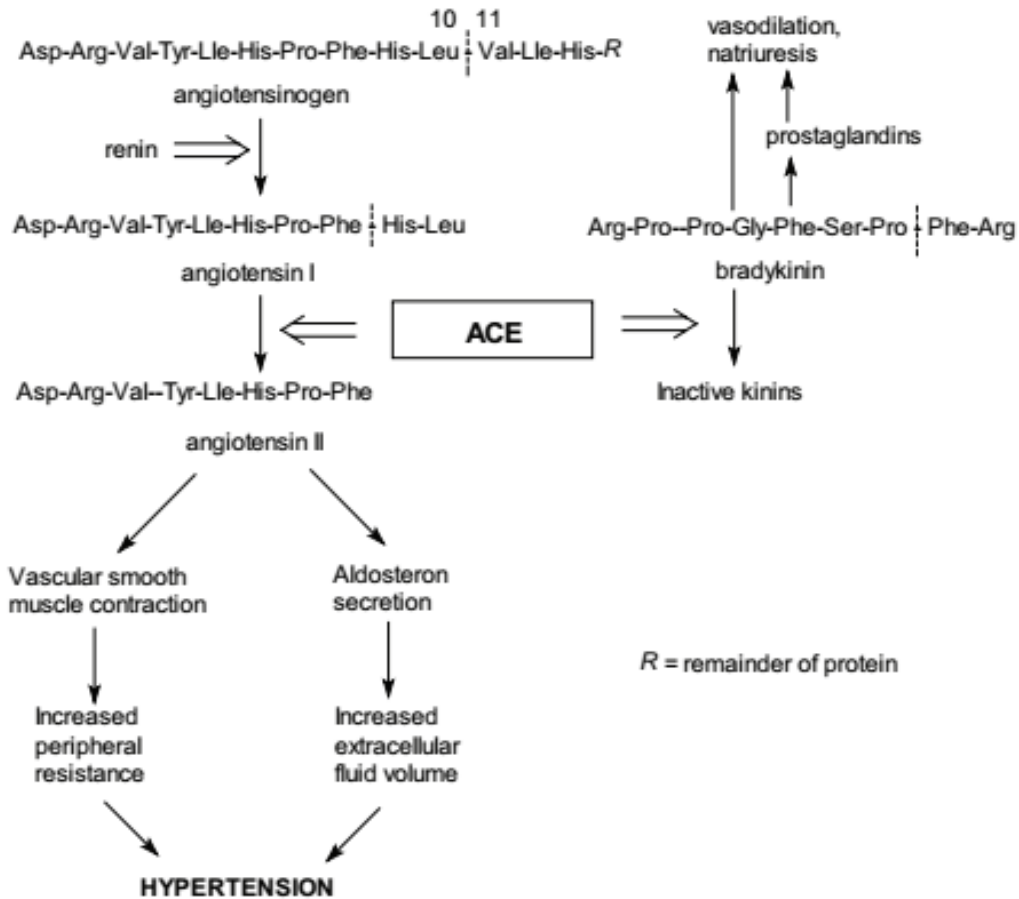
Mushrooms are used as therapeutics in alternative and complementary medicine as functional food because they contain a large number of biologically active components that offer health benefits and protection against many degenerative diseases. *Morchella esculenta* is one of the most highly priced edible mushrooms worldwide. It contains a wide range of active constituents which include tocopherols, carotenoids, organic acids, polysaccharides and phenolic compounds which exhibit a wide range of medicinal and pharmacological properties including anti-microbial, anti-inflammatory, immunostimulatory, antitumor and antioxidant. In this study; the peptide fragments were generated by alcalase hydrolysis from *M. esculenta* extracts were fractionated using ultrafiltration membranes. ACE inhibition was studied in the obtained fractions. The 5kDa <peptides> 10 kDa in the ultrafiltration fractions displayed highest ACE inhibition (94 %). The IC₅₀ value of this fraction was calculated as 4,2 µg/ml. The peptide numbers and purity of fraction were determined with 12 % SDS-PAGE. The results indicate that *M. esculenta* derived peptides may have potential as functional food ingredients in the prevention and management of hypertension.

Key words: Angiotensin converting enzyme-I, hypertension, protein hydrolysate, ultrafiltration, enzyme inhibition.

Giriş

Kardiyovasküler hastalıklar; kalp veya kan damar hastalıklarını kapsayan gruba verilen genel bir isimlendirmedir. Kardiyovasküler hastalıklar özellikle son on yıl içinde tüm dünyada bir numaralı ölüm nedeni haline gelmiştir. Her yıl dünyada 17 milyona yakın kişi kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle yaşamını yitirmektedir. Kardiyovasküler hastalıklarının çıkış nedenleri çeşitlilik göstermekle birlikte en sık karşılaşılan nedenlerinin başında hipertansiyonun yer aldığı vurgulanmaktadır. Hipertansiyon Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 'ne göre dünyadaki her sekiz ölümden birinin sorumlusu en öldürücü üçüncü hastalık grubu olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi hipertansiyon gibi ana risk faktörlerinin kontrol altına alınması ile mümkündür (Gün ve Korkmaz, 2014). Aşırı kiloların verilmesi, düzenli egzersiz, tuz alımının kontrolü veya kısıtlanması, sigara ve alkolden kaçınma, diyetdeki yağların kontrol altına alınması, sınırdaki hipertansiyonun kontrol altına alınmasını sağlayan önemli faktörlerdir (Barbosa-Filho ve ark., 2006). Ancak orta veya şiddetli hipertansiyonun kontrolünde ilaç tedavisi uygulanması gerekli olup,

bu tedavi bir veya birkaç ilacın kombine şekilde kullanılması ile gerçekleştirilmektedir. Hipertansiyon ilaçlarının istenmeyen yan etkiler oluşturmalarının yanında, bazı hastalarda çoklu ilaç uygulamalarına rağmen hipertansiyonun kontrol altına alınamadığı görülmüştür. Bu yüzden hipertansiyonun kontrolü için daha etkin yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi bir zorunluluk haline almıştır (Calhoun ve ark., 2008). Renin-angiotensin sisteminin kan basıncının kontrolünde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Böbrekte sentezlenen renin biyolojik olarak inaktif decapeptid olan angiotensinojeni angiotensin I'e dönüştürür. Daha sonra angiotensin I; angiotensin I dönüştürücü enzim (ACE-I) ile oktopeptid (vazokonstriktör) angiotensin II'ye dönüştürülür. Bu reaksiyon kan damarlarında daralmaya, dolayısıyla kan basıncının yükselmesine neden olur (Sweitzer, 2003). ACE aktivitesinin inhibe edilmesi angiotensin II konsantrasyonu azalmasına, bradikinin seviyesinin artmasına bunların sonucunda da kan basıncının düşmesine neden olmaktadır (Hansen ve ark., 1995-1996). Bu yüzden hipertansiyon hastalığının tedavisinde benimsenen yaklaşımlardan biri de ACE enziminin inhibisyonunun gerçekleştirilmesidir (Şekil 1).



Şekil 1. ACE-I'in hipertansif etkisi(Hansen ve ark., 1995-1996).

Çizelge 1. Bazı mantar türlerinde tespit edilen biyolojik aktiviteler

Biyolojik Etki	Mantar türü	Kaynaklar
ACE inhibitörü	<i>Pholiota adiposa</i> <i>Antrodiella liebmannii</i>	Koo ve ark., 2006
Antianjiogenik	<i>Agaricus murrill</i> <i>Rigidoporus ulmarius</i> <i>Fomes lignosus</i>	Chen ve ark., 2005
Antifungal	<i>Marasmius jodocodo</i> <i>Pleurotus florida</i> <i>Ganoderma lucidum</i>	Gbolagade ve ark., 2007
Hipoglisemik	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Phellinus baumii</i>	Jeong ve ark., 2010 Hwang ve ark., 2005
Antienflamatuar	<i>Agrocybe aegerita</i> <i>Termitomyces albuminosus</i> <i>Russula cyanoxantha</i> <i>Amanita rubescens</i> <i>Amanita caesarea</i> <i>Suillus granulatus</i> <i>Boletus edulis</i> <i>Phellinus rimosus</i> <i>Pleurotus florida</i> <i>P.cystidiosus</i> <i>P.ostreatus</i>	Diyabalanage ve ark., 2008 Lu ve ark., 2008
Antioksidan	<i>P.sajor-caju</i> <i>Ganoderma lucidum</i> <i>Agaricus bisporus</i> <i>Lactarius deliciosus</i> <i>Cantharellus cibarius</i> <i>Lentinus edodes</i> <i>Pleurotus sp</i> <i>Morchella esculenta</i> <i>Flammulina velutipes</i> <i>Lentinula edodes</i> <i>Agrocybe aegerita</i> <i>Ganoderma lucidum</i>	Ribeiro ve ark., 2008 Lakshmi ve ark., 2004 Ram´irez Anguiano ve ark., 2007 Yang ve ark., 2002
Antikanserojen (Antitümör)	<i>Phellinus gilvus</i> <i>Agaricus blazei</i> <i>Phellinus rimosus</i>	Diyabalanage ve ark., 2008 Stanley at al., 2005 Bae ve ark., 2005 Kaneno ve ark., 2004 Ajith ve Janardhanan, 2003

ACE'nin inhibisyonuna yönelik captopril, enalapril, alacepril ve lisinopril gibi çeşitli sentetik inhibitörler geliştirilmiştir. Bununla birlikte bu sentetik inhibitörlerin kuru öksürük, ciltte dökülme, tat alma duyusunda bozukluk, anjiödem, fetal anomaliler, yüksek kalsiyum değerleri, alerjik reaksiyonlar (Yu ve ark., 2006; Yahaya ve ark., 2014) gibi belli yan etkilere neden olması araştırmacıları sentetiklere göre daha ılımlı ve güvenli inhibitörlerin arayışına yönlendirmiştir. Özellikle kolay adsorbe edilmeleri ve çok fonksiyonel özelliklere sahip olmaları sebebiyle çalışmalar protein türevli kaynaklardan elde edilen peptidler üzerine yoğunlaştırılmıştır. Çalışmalarda peptid kaynağı olarak kazein (Miguel ve ark., 2009), üzüm çekirdeği, mantar, patates, whey

proteinleri(Pihlanto ve ark., 2000-2008) , süt (Tsai ve ark., 2008; Nakamura ve ark., 1995), karabuğday (Ma ve ark., 2006), domuz ve tavuk kası, balık proteini (Sentandreu ve ark., 2007; Je ve ark., 2007, Wu ve ark., 2008; Lee ve ark., 2010), soya fasulyesi proteini (Kuba ve ark., 2005) gibi protein kaynakları kullanılmıştır. Ekosistemin en önemli parçalarından biri olan makromantarlar; zengin besin içerikleri (protein, karbonhidrat, yağ asidi vitamin ve minerallerce) ve kendilerine has spesifik aroma ve tatları sayesinde hızlı artan dünya nüfusu için önemli bir besin kaynağını oluşturmaktadırlar. Makromantarların besin olarak tüketilmelerinin dışında sahip oldukları farmakolojik karakterler sayesinde Çin ve Japonya başta olmak üzere bir çok uzak Asya ülkesinde çeşitli hastalıklara karşı

geleneksel tıpta ilaç olarak kullanıldığı da bilinmektedir (Barros ve ark., 2008; Üstün, 2011). Makromantarlardan saflaştırılan çok sayıda doğal bileşenin (küçük metabolitler, proteinler, polisakkaritler, protein-polisakkarit kompleksleri vb.) antioksidant, antifungal, antitümör, antiviral, antibakteriyel ve immunomodülatör ajan olarak iş görmeleri, özellikle saflaştırılan birkaç mantar bileşeni ile kanser ve diğer hastalıkların tedavisine yönelik klinik faz (I-II-III) denemelerine geçilmesi (Xu ve ark., 2011) birçok araştırmacının makromantarlar olana ilgisini arttırmıştır (Çizelge 1). Makromantarların gıda ve medikal uygulamalar dışında biyoteknolojik uygulamalarda da biyokütle, organik asit (Pandey ve ark.,2000), enzim (Zheng ve Shetty, 2000) ve inhibitör (Lau ve ark., 2013) gibi metabolik ürünlerin elde edilmesinde kullanıldığı, yüksek protein içerikleri sebebiyle de beslenme yetersizliği görülen kişilerde gıda takviyesi ve bağışıklığı artırıcı bir ticari ürün olarak tablet formları satıldığı bilinmektedir. Ayrıca makromantarlar zengin protein içerikleri ve bütün esansiyel aminoasitleri içermelerinden dolayı da vejeteryanlar tarafından en çok tercih edilen gıdaların başında yer almaktadır. Makromantarlarda bulunan protein miktarı mantar tür ve çeşidine göre değişmekle birlikte ortalama olarak 100 g mantarda 3-8 g olduğu belirtilmektedir (Erkel, 1992). Mantarlarda yer alan proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu elde edilen spesifik peptid fragmanlarında farklı biyolojik aktivitelerin gözlenmesi mantarların biyoaktif peptidlerce zengin olduklarını ortaya koymaktadır. *Morchella esculenta* askılı mantarların (Ascomycetes) Morchellaceae familyasında yer alan yenilebilir bir mantar türüdür. *M.esculenta* proteinler, polisakkaritler vitaminler, iz elementler, az bulunan amino asitler gibi biyolojik olarak aktif birçok bileşen içermektedirler. *M. esculenta*'nın bilinen majör farmakolojik aktif kimyasal bileşenleri polisakkaritler olup bunlar antiviral, antitümör ve karaciğer koruyucu gibi çeşitli medikal aktivitelere sahiptir. Bu çalışmada; proteince zengin, yenilebilir bir mantar türü olan *Morchella esculanta*'dan ACE inhibisyonu için yeni peptid inhibitörlerinin elde edilmesi planlandı. İlk olarak *Morchella esculanta* protein ekstraktları, ACE inhibitör aktivitesine sahip peptid inhibitörlerini elde etmek için alkalaz enzimi ile hidrolizlendi. Peptid inhibitörlerin ayırımında ultrafiltrasyon membran sistemi kullanıldı. ACE inhibitör etkisi gösteren peptidlerin SDS-PAGE ile moleküler kütleleri tanımlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Kimyasallar

NaCl, Sükroz, NaOH, Na₂CO₃ (Riedel); Triton X-100, Tris, FAPGG (N-[3-(2-Furil)akrilolil] L-fenilalanil-glisil-glisin), Glisin, 6-ACA (6-amino kaproik asit) (Sigma); Etanolamin, CaCl₂, MgCl₂, Hidroklorik asit, Amonyum sülfat, Metil- α -D-mannopiranozid, TCA(Trikloro asetik asit), K₂CO₃, Na-asetat, Na₂B₄O₇ (Sigma-Aldrich); ZnCl₂ (Carloerba); DMF(N,N-Dimetilformamid), DIEA (N,N-Diizopropiletilenamin) , HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl uronium hexafluorophosphate) (Acros); HOBt (1-hidroksibenzotriazol) (Aldrich); Lisinopril (Santacruz); Sığır serum albümin (BSA) (Fluka); pABA (p-aminobenzoik asit), PVP(polivinilpirolidon) (Alfa Aesar); Vitamin C (Roth); % 2 β -Merkaptoetanol, Aseton (Merck); Alkalaz (Novonordisk); 3kDa, 5kDa ve 10kDa santrifugal ultrafiltrasyon membran kartuşları (Millipore), Con A (HiTrap™ Con A 4B) affinite kolon, Epoksi aktive edilmiş Sefaroz 6B (GE Healthcare). Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

ACE-1 enzim preparatının hazırlanması

Koyun akciğerinden ACE-I enzim ekstraktının hazırlanmasında ilk olarak 0,15 M NaCl içeren 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) tamponu ile perfüzyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından 0,25 M Sükroz ve % 1 (v/v) Triton X-100 içeren 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) tamponu ile homojenize edildi. Homojenat daha sonra 10.000 rpm'de 30 dakika 4 °C'de santrifüjlendi. Süpernatant ayrılarak % 60 amonyum sülfat (AS) çöktürmesine tabi tutuldu. AS çöktürmesi sonrası örnek 13.500 rpm'de 30 dakika 4 °C'de santrifüjlendi. Pellet 10 mM Tris pH 7.4 tamponuna karşı diyalizlendi. Diyalizlenen örnek Con A afinite kolona uygulandı. Kolon akış hızı 0,2 ml/dakika olarak gerçekleştirildi. Fraksiyonlar 1 ml olarak toplandı. Con A afinite kolonundan ACE enziminin elüsyonu 0,2 M metil- α -D-mannopiranozid içeren dengeleme tamponu (0,15 M NaCl, 1 mM MgCl₂ ve 1 mM CaCl₂ içeren 20mM Tris-HCl pH 7,4) ile yapıldı. Aktif fraksiyonlar birleştirilerek 10.000 MWCO'luk ultrafiltrasyon tüpünde konsantre edildi. Konsantre örnek 0,3 M NaCl ve 100 μ M ZnCl₂ içeren 20 mM Tris-HCl pH:7,2 tamponu ile dengelenen Lisinopril afinite kolona uygulandı. Kolon akış hızı 0,2 ml/dakika olarak gerçekleştirildi. Fraksiyonlar 1 ml olarak toplandı. Kolondan elüsyon 50 mM Na₂B₄O₇ (pH:9,5) ile yapıldı. Aktif fraksiyonlar birleştirilerek 10.000 MWCO'luk ultrafiltrasyon tüpünde konsantre edildi. Tüm saflaştırma adımlarında protein ve aktivite tayini yapıldı. Saflaştırılan ACE enzimi; inhibitör taramasında enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Lisinopril Afinite kolonun hazırlanması

Lisinopril afinite kolonun hazırlanması Chen ve arkadaşları tarafından uygulanan protokole göre gerçekleştirildi (Chen ve ark., 2010) Protokol kısaca özetlenecek olursa; 384 mg pABA (2,8 mmol) 12 ml DMF ve 0,5 ml DIEA'da çözüldükten sonra, su içerisinde süspansiyon 4 g epoksi aktive edilmiş Sefaroz 6B ile karıştırıldı. Bağlanma reaksiyonu oda sıcaklığında 15 saat nazikçe karıştırılarak gerçekleştirildi. Daha sonra matriks DMF ve H₂O ile yıkanarak filtre edildi. Kalan epoksi grupları 20 ml 1 M etanolamin ile 1 saat muamele edilerek blokaj yapıldı. Matriks tekrardan önce su sonra DMF ile yıkandı. 6-ACA ile bağlanma reaksiyonunun gerçekleştirilebilmesi için modifiye sefaroz 12 ml DMF ve 0,2 ml DIEA'da çözülmüş 1,1 g HBTU (2,8 mmol) ve 378 mg HOBt (2,8 mmol) ile 2,5 saat aktive edildi. Filtrasyon işlemi sonrası 12 ml 0,1 M Na₂CO₃ (pH 11,8) içerisinde çözülmüş 551 mg 6-ACA (4,2 mmol) ile 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bağlanma işlemi tamamlandıktan sonra matriks filtre edilerek önce H₂O daha sonra DMF ile yıkandı. Matrikse ligand olarak lisinoprilin bağlanması için tekrardan HBTU/HOBt ile aktive edildi. 0,1 M K₂CO₃ (pH 11,8) içerisinde çözülen 486 mg lisinopril (1,2 mmol) ile matriks 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bağlanma sonrası blokaj işlemi 1 M glisin (pH: 10,0) ile gerçekleştirildi. Matriks önce su daha sonra 0,5 M NaCl içeren Tris-HCl (pH:8.5) ve Na-asetat (pH: 4,5) tamponları ile yıkanarak 0,3 M NaCl ve 100 µM ZnCl₂ içeren 20 mM Tris-HCl pH:7,2 tamponu ile dengelendi.

Protein tayini

Protein tayinleri; sığır serum albuminin standart olarak kullanıldığı, Bradford (1976) yöntemine göre (mikroplate format) gerçekleştirildi. 10 µl her bir standart (25 – 150 µg/ml sığır serum albumin), bilinmeyen örnek ve distile su (kör) mikro plaka kuyucuklarına pipetlendi. Üzerlerine 200 µl Bradford reaktifi ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 595 nm de absorbansları okundu. Standartlar ile oluşturulan kalibrasyon eğri ve katsayılar yardımı ile seyrelme faktörleri de göz önüne alınarak protein konsantrasyonları hesaplandı. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Morchella esculanta mantarının toplanması ve teşhisi

Morchella esculanta Mart-Mayıs aylarında Denizli ili çevresinden toplandı ve tür teşhis makroskobik ve mikroskobik özelliklerine göre referans kitaplar kullanılarak yapıldı.

Morchella esculanta'dan protein ekstraktının hazırlanması

Toplanan mantarlar laboratuvarında havada kurutulduktan sonra bir blender yardımıyla toz haline getirildi. 10 g kurutulmuş toz halindeki mantar; % 1,5 PVP, % 1 vitamin C ve 0,15 M NaCl içeren 50 mM Tris pH:7,3 tamponu ile homojenize edilerek 2-3 saat karıştırıcıda karıştırıldı. Homojenat çift katlı tülbent bezinden süzildükten sonra 5000 g'de 30 dakika santrifüjlendi. Süpernatanta g doku başına/10 ml %10 TCA-Aseton (% 2 β-Merkaptoetanol içeren) eklendi. Süpernatant -20°C'de 12 saat bekletildi. Çöken pellet 5000 g'de 30 dakika santrifüjlenerek ayrıldı. Pellet 3 kez soğuk asetonla (%100) yıkandı ve her yıkama sonrası 5000 g'de 15 dakika santrifüjleme işlemi gerçekleştirildi. Pellet açık havada kurutulduktan sonra -80°C'de saklandı. Pelletin protein içeriği Bradford yöntemi ile belirlendi.

Protein ekstraktlarından enzimatik hidrolizi ile peptid hidrolizatlarının hazırlanması

Elde edilen pellet 50 °C'deki bir su banyosu içerisinde distile su ile (% 5 w/v) oranında süspansiyon edildi. pH 8,0'e ayarlandı. Alkalaz enzimi enzim/substrat oranı (4/100) olacak şekilde eklenerek karışım enzimatik parçalama için 4 saat inkübe edildi. Reaksiyon karışımının pH'sı 2 M NaOH kullanılarak 4 saat boyunca sabit tutuldu. Enzimatik reaksiyon karışımın 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilmesi ile sonlandırıldı. Enzimatik parçalamaya uğramayan proteinler 8000 g'de 60 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Peptidleri içeren süpernatant ultrafiltrasyon membranları ile fraksiyonlanmak üzere -20°C'de saklandı.

Ultrafiltrasyonla protein hidrolizatındaki peptidlerin fraksiyonlanması

Enzimatik hidroliz sonrası elde edilen peptidlerin fraksiyonlanmasında santrifugal ultrafiltrasyon membran kartuşları (3kDa, 5kDa, 10kDa) kullanıldı. Ayrım en büyük membrandan (10 kDa) başlayarak en küçüğe doğru uygulandı. Molekül büyüklüklerine göre ayrımı yapılan peptid fraksiyonlarında ACE-I inhibitör aktivitesine bakıldı.

Peptid fragmanlarının ACE-I inhibitör aktivite tayini

ACE-I enzim aktivitesi; FAPGG substratının ACE enzimi tarafından hidrolizinin gerçekleştirilmesiyle belirlendi (Şekil 2).

Bu işlemde kısaca; elde edilen peptid fragmanlarının 10 µl'si, koyun akciğerinden saflaştırılan ACE enziminin 10 ul'si ile 37 °C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra, üzerlerine 150 µl

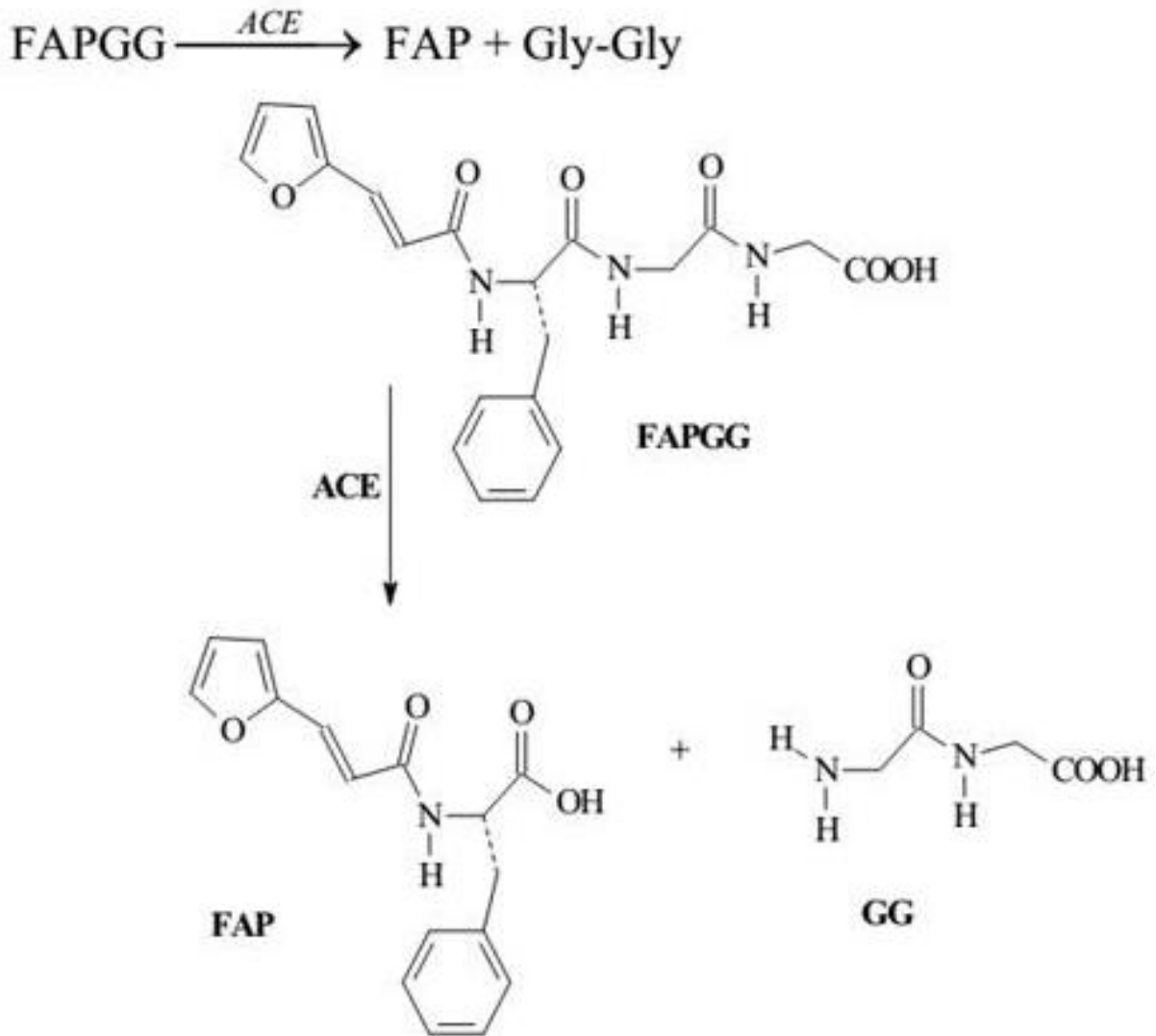
FAPGG (0,88 mM) substratı eklenerek reaksiyon başlatıldı. Başlangıçta ve 10 dakika sonunda; 340 nm'deki absorbans değerleri kaydedildi. Peptid fragmanları yerine 10 µl tampon (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.3 M NaCl) içeren kontrol örnekleri içinde aynı işlemler uygulandı. Örnek ve kontrol örnek ölçümleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. % ACE inhibisyonu aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplandı.

$$\% \text{ ACE inhibisyonu} = 1 - (A_{\text{inhibitor}} - A_{\text{control}}) \times 100$$

Mantardan elde edilen peptid fragmanlarının inhibitör etkinliği ticari inhibitör (Lisinopril) kullanılarak IC₅₀ değerleri kıyaslandı.

SDS-PAGE

Saflaştırılan ACE-I saflık kontrolü (% 12'lik jel yüzdesi ile) Laemmli metoduna göre SDS-PAGE ile belirlendi. (Laemmli, 1970).



Şekil 2. FAPGG substratının ACE enzimi tarafından hidrolizi.

Bulgular ve Tartışma

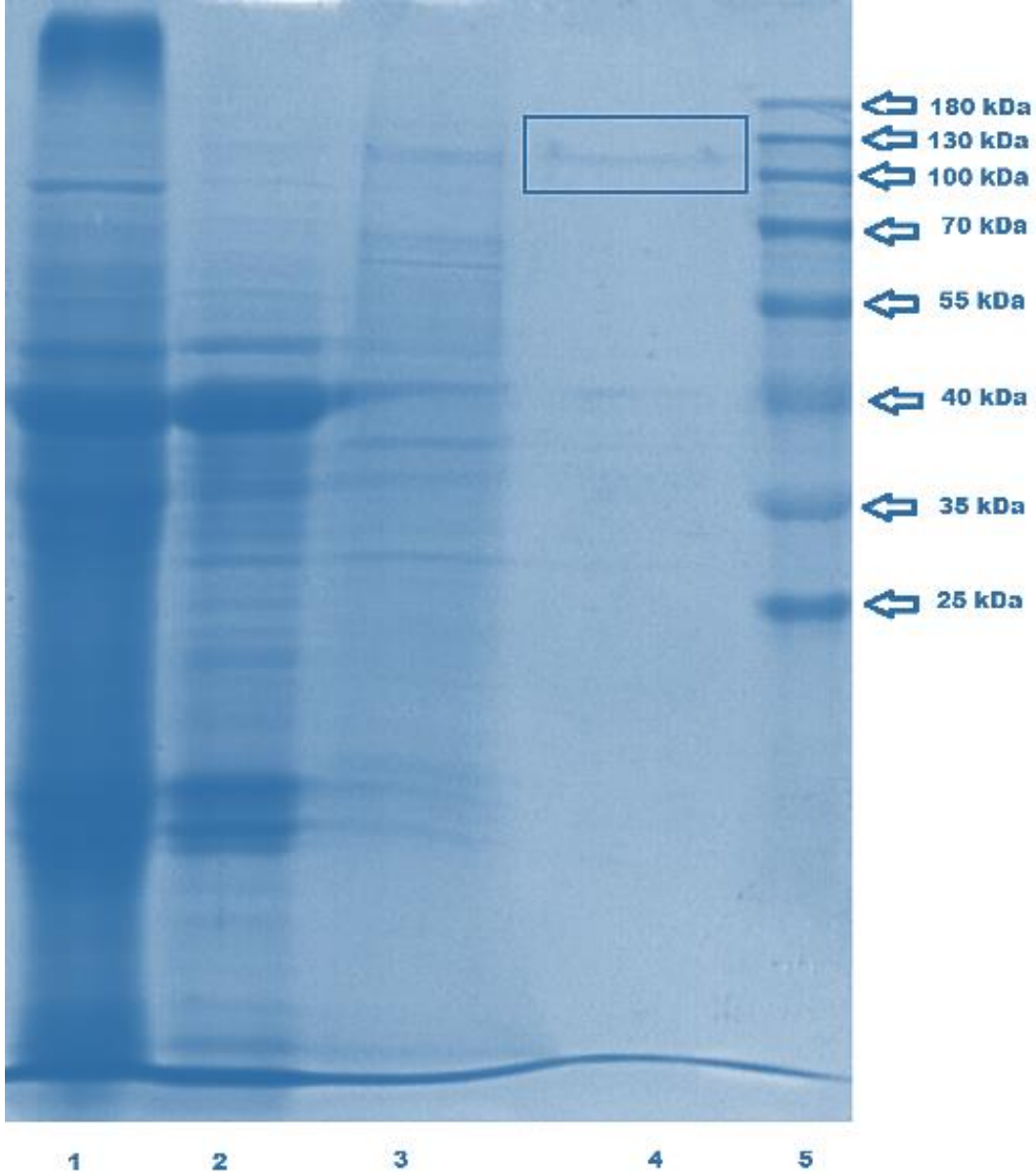
Bu çalışmada; anjiyotensin dönüştürücü enzim-I, koyun akciğerinden amonyum sülfat çöktürmesi, Con A ve Lisinopril Sefaroz afinite kromatografileri kullanılarak % 1.5 verimle 349 kat saflaştırıldı (Çizelge 2). SDS-PAGE (Şekil 3).

Morchella esculenta mantarından proteinler % 10 TCA-Aseton (% 2 β-Merkaptoetanol içeren)

çöktürmesi ile elde edildi. Elde edilen protein ekstratı enzim (alkalaz) kullanılarak peptid fragmanlarına ayrıldı. Ayrılan peptid fragmanları ultrafiltrasyon membranlar kullanılarak (3kDa, 5kDa, 10kDa) fraksiyonlandı. Elde edilen fraksiyonlarda ACE-I inhibisyonu araştırıldı. 10 kDa ile 5 kDa arasında yer alan peptidlerin enzim inhibisyonunda etkin olduğu gözlemlendi.(Çizelge 3).

İnhibisyon etkinliği yüksek olan 10 kDa ile 5 kDa arasında peptidlerin yer aldığı fraksiyonun IC_{50} değeri hesaplandı. Kontrol olarak ACE-I'in ticari inhibitörü lisinopril kullanıldı. Peptid fraksiyonu için

IC_{50} değeri 4,2 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanırken, lisinopril için 11,2 ng/ml olarak hesaplandı (Çizelge 4).



Şekil 3. Koyun akciğerinden anjiyotensin dönüştürücü enzim l'in saflaştırma adımlarının SDS-PAGE uygulaması.1. Kuyu, ham ekstrakt; 2.Kuyu, amonyum sülfat çöktürmesi(%60); 3.Kuyu, Con A afinite kromatografisi; 4.Kuyu, Lisinopril-Separoz afinite kromatografisi; 5.Kuyu, moleküler kütle standartları (Thermo-26616).

Çizelge 2. Koyun akciğerinden Anjiyotensin dönüştürücü enzim l'in saflaştırılması

Saflaştırma Adımı	Total protein (mg)	Total aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (Aktivite) (%)
Homojenat*	3224	127	0.039	1	100
% 60 Amonyum Sülfat çöktürmesi	324	31	0.096	2.5	24
Con A kromatografisi	2.7	9.5	3.52	90	8
Lisinopril-Separoz kromatografisi	0.14	1.9	13.6	349	1.5

* Homojenat 400 g koyun akciğerinden hazırlandı.

Çizelge 3. *Morchella esculenta* ekstrakt ve ultrafiltrasyon ile elde edilen fraksiyonlarında Anjiotensin dönüştürücü enzim I inhibitör aktivitesinin taranması

Test materyali	ACE-I aktivitesi (U/L)	İnhibisyon (%)
<i>M.esculenta</i> ekstrakt	378.8	17
<i>M.esculenta</i> ekstrakt alkalaz hidrolizi sonrası	377.3	17
Peptid>10 kDa	-	İnhibisyon yok
10 kDa>peptid>5kDa	27.6	94
5 kDa>peptid>3kDa	93.6	79
Peptid< 3 kDa	159.5	65
ACE-I (kontrol)	456.4	-

Çizelge 4. *Morchella esculenta* ve Lisinopril'in Anjiotensin dönüştürücü enzim I inhibitör aktivitesi

Test Materyali	Konsantrasyon	ACE-I aktivitesi (U/L)	İnhibisyon (%)	IC ₅₀
10 kDa>peptid>5kDa (µg/ml)	1	486.2	0	4.2
	2	342.0	30	
	4	171.8	65	
	6	131.9	73	
	8	92.0	81	
	12	59.8	88	
	16	41.4	92	
	22	35.3	93	
	28	24.5	95	
	Lisinopril (ng/ml)	4	117.7	
8		84.4	31	
12		50.9	58	
16		27.2	78	
20		17.6	86	
40		11.1	91	

Araştırmacılar tarafından çeşitli yenilebilir mantar türlerinin sulu ve alkolik ekstraktlarında ACE inhibitör aktivitesi sahip peptidler tespit edilmiştir. *Pholiota adiposa*'dan saflaştırılan penta peptidin(Gly-Glu-Gly-Gly-Pro) ACE inhibitör aktivitesi için IC₅₀ değeri 0,25 mg/ml (Koo ve ark., 2006); *Hypsizygus marmoreus*'den saflaştırılan oligopeptid (LSMGSASLSP) için 0,19 mg/ml (Kang ve ark., 2013), *Pleurotus cystidiosus*'den saflaştırılan iki peptid (AHEPVK ve GPSMR) için 62,5 ve 277,5 µg/ml (Lau ve ark., 2013), *Pleurotus cornucopiae*'den saflaştırılan iki oligopeptid (RLPSEFDLSAFLRA ve RLSGQTIEVTSEYLFRRH) için 0.46 and 1.14 mg/ml (Jang ve ark., 2011), *Tricholoma giganteum*'den saflaştırılan tripeptid (Gly-Glu-Pro) için 0,31 mg/ml (Hyoung Lee ve ark., 2004), *Grifola frondosa*'dan saflaştırılan heksapeptid (Val-Ile-Glu-Lys-Tyr-Pro) için 0,13 mg/ml (Choi ve ark., 2001). olarak hesaplanmıştır.

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada *Morchella esculenta* mantarından ACE inhibitör aktivitesi için bulunan IC₅₀ değeri araştırmacılar tarafından elde edilen IC₅₀ değerinden çok daha düşüktür. Ancak; *Morchella esculenta* mantarından elde edilen peptid

fraksiyonunun inhibitör etkisi, ACE'nin ticari inhibitörü lisinopril ile kıyaslandığında IC₅₀ değerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte ACE'nin ticari inhibitörlerinin kuru öksürük, ciltte dökülme, tat alma duyusunda bozukluk, anjiödem, fetal anomaliler, yüksek kalsiyum değerleri ile alerjik reaksiyonlara sebep olmaları dikkate alındığında *Morchella esculenta*'dan elde edilecek doğal inhibitörün hipertansiyon hastalığının tedavisinde ACE-I enzimi için alternatif ilaç olarak değerlendirilebileceği söylenebilir.

Araştırmanın ileri yönelik hedefleri olarak; ACE-I inhibisyonu gösteren fraksiyondaki peptidin dizisinin tanımlanması, peptidin rekombinant üretimi, model hayvan denemeleri ile peptidin etkinliğinin canlı sistem üzerinde uygulanması düşünülebilir.

Teşekkür

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2015HZL013 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Ajith, T.A., Janardhanan, K.K. 2003. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat., J Ethnopharmacol., 84(2-3): 157-62.
- Bae, J.S., Jang, K.H., Yim, H., Jin, H.K. 2005. Polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* inhibit melanoma growth in mice. Cancer Lett., 218(1): 43-52.
- Barbosa-Filho, J.M., Martins, V.K.M., Rabelo, L.A., Moura, M.D., Silva, M.S., Cunha, E.V.L., Souza, M.F.V., Almeida, R.N., Medeiros, I.A. 2006. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000, Brazilian Journal of Pharmacognosy, 16(3): 421-446.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L.M., Ferreira, I.C. 2008. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. Food Chem. Toxicol., 46(8): 2742-2747.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Calhoun, D.A., Jones, D., Textor, S., Goff, D.C., Murphy, T.P., Toto, R.D., White, A., Cushman, W.C., White, W., Sica, D., Ferdinand, K., Giles, T.D., Falkner, B., Carey, R.M. 2008. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment. A scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research, Hypertension. 51(6):1403-1419.
- Chen, S.C., Lu, M.K., Cheng, J.J., Wang, D.L. 2005. Antiangiogenic activities of polysaccharides isolated from medicinal fungi, FEMS Microbiology Letters, 249: 247-254.
- Chen, H.L., Lünsdorf, H., Hecht, H.J., Tsai, H. 2010. Porcine pulmonary angiotensin I-converting enzyme-biochemical characterization and spatial arrangement of the N- and C-domains by three-dimensional electron microscopic reconstruction. Micron., 41(6): 674-85.
- Choi, H.S., Cho, H.Y., Yang, H.C., Ra, K.S., Suh, H.J., 2001. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*. Food Res. Int., 34: 177-182.
- Diyabalanage, T., Mulabagal, V., Mills, G., DeWitt, D.L., Nair, M.G. 2008. Health-beneficial qualities of the edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. Food Chem., 108: 97-102.
- Erkel, İ. 1992. Dünya’da ve Türkiye’de kültür mantarcılığının durumu. Türkiye 4. Yemeklik Mantar Kongresi, Cilt I. Yalova.
- Gbolagade, J.S., Kigigha, L., Ohimai, E. 2007. Antagonistic effect of extracts of some Nigerian higher fungi against selected pathogenic microorganisms. American Eurasian Journal of Agriculture, Environment and Science, 2(4): 364-368.
- Gün, Y., Korkmaz, M. 2014. Hipertansif hastaların tedavi uyumu ve yaşam kalitesi. DEUHYO ED., 7(2): 98-108.
- Hansen, K., Nyman, U., Smitt, U.W., Adersen, A., Gudiksen, L., Rajasekharan, S., Pushpangadan, P. 1995. *In vitro* screening of traditional medicines for anti-hypertensive effect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE). J. Ethnopharmacol., 48: 43-51.
- Hansen, K., Adersen, A., Christensen, S.B., Jensen, S.R., Nyman, U., Smitt, U.W. 1996. Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lancea*. Phytomedicine, pp. 319-325.
- Hyoung Lee, D., Ho, Kim, J., Sik Park J., Jun Choi, Y., Soo Lee, J. 2004. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. Peptides, 25(4): 621-627.
- Hwang, H.J., Kim, S.W., Lim, J.M., Joo, J.H., Kim, H.O., Kim, H.M., Yun, J.W. 2005. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sci., 76(26): 3069-3080.
- Je, J.Y., Qian, Z.J., Byun, H.G., Kim, S.K. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Process Biochemistry, 42: 840-846.
- Jang, J.H., Jeong, S.C., Kim, J.H., Lee, Y.H., Ju, Y.C., Lee, J.S., 2011. Characterization of a new antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Pleurotus cornucopiae*. Food Chem., 127(2): 412-428.
- Jeong, S.C., Jeong, Y.T., Yang, B.K., Islam, R., Koyyalamudi, S.R., Pang, G., Cho, K.Y., Song, C.H. 2010. White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. Nutr. Res., 30(1): 49-56.
- Kaneno, R., Fontanari, L.M., Santos, S.A., Di Stasi, L.C., Rodrigues Filho, E., Eira, A.F. 2004.

- Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. *Food Chem. Toxicol.*, 42(6): 909-916.
- Kang, M.G., Kim, Y.H., Bolormaa, Z., Kim, M.K., Seo, G.S., Lee, J.S. 2013. Characterization of an antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Biomed Res Int.*, 2013: 283964 (pp. 1-6).
- Koo, K.C., Lee, D.Y., Kim, J.H., Yu, H.E., Park, J.S., Lee, J.S. 2006. Production and characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Pholiota adiposa*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 16(5): 757-763.
- Kuba, M., Tana, C., Tawata, S., Yasuda, M. 2005. Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. *Process Biochemistry*, 40: 2191-2196.
- Lau, C.C., Abdullah, N., Shuib, A.S., 2013. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from an edible mushroom, *Pleurotus cystidiosus* O.K. Miller identified by LC-MS/MS. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(313): 1-10.
- Lakshmi, B. Tilak, J.C. Adhikari, S. Decasagayam, T.P.A. Janardhanan, K.K. 2004. Evaluation of antioxidant activity of selected Indian mushrooms. *Pharmaceutical Biology* 42: 179-185.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
- Lee, S.H., Qian, Z.J., Kim, S.K. 2010. A novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 118: 96-102.
- Lu, Y.Y., Ao, Z.H., Lu, Z.M., Xu, H.Y., Zhang, X.M., Dou, W.F., Xu, Z.H. 2008. Analgesic and anti-inflammatory effects of the dry matter of culture broth of *Termitomyces albuminosus* and its extracts. *J. Ethnopharmacol.*, 120(3): 432-436.
- Ma, M.S., Bae, I.Y., Lee, H.G., Yang, C.B. 2006. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Food Chemistry*, 96(1): 36-42.
- Miguel, M., Contreras, M. M., Recio, I., & Aleixandre, A., 2009. ACE inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. *Food Chemistry*, 12:211–214.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano, T. 1995. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78(4): 777-783.
- Pandey, A., Soccol, C.R. 1998. Bioconversion of biomass: A case study of lignocellulosic bioconversions in solid state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 41: 379-390.
- Pihlanto, A., Akkanen, S., Korhonen, H.J. 2008. ACE inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Chemistry*, 109(1): 104-112.
- Pihlanto, L. 2000. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory. *Trends Food Science and Technology*, 11: 347-356.
- Ramírez-Anguiano, A.C., Santoyo, S., Reglero, G., Soler-Rivas, C. 2007. Radical scavenging activities, endogenous oxidative enzymes and total phenols in edible mushrooms commonly consumed in Europe. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 2272-2278.
- Ribeiro, B., Lopes, R., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Gonçalves, R.F., Baptista, P., Quelhas, I., Valentão, P.C. 2008. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food Chem.*, 110(1): 47-56.
- Sentandreu, M.A., Fidel Toldra, F. 2007. Evaluation of ACE inhibitory activity of dipeptides generated by the action of porcine muscle dipeptidyl peptidases. *Food Chemistry*, 102(2007): 511-515.
- Stanley, G., Harvey, K., Slivova, V., Jiang, J., Sliva, D. 2005. *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-beta1 from prostate cancer cells., *Biochem Biophys Res Commun.*, 330(1): 46-52.
- Sweitzer N.K. 2003. What is an angiotensin converting enzyme inhibitor? *Circulation*. 108: 16-18.
- Üstün, O. 2011. Makrofungusların besin değeri ve biyolojik etkileri. *Turk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 68(4): 223-240.
- Wu, H., He, H.L., Chen, X.L., Sun, C.Y., Zhang, Y.Z., Zhou, B.C. 2008. Purification and identification of novel angiotensin- I-converting enzyme inhibitory peptides from

- shark meat hydrolysate. *Process Biochemistry*, 43: 457-461.
- Xu, X., Yan, H., Chen, J., Zhang, X. 2011. Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnol. Adv.*, 29: 667-674.
- Yahaya, N.F.M., Rahman, M.A., Abdullah, N. 2014. Therapeutic potential of mushrooms in preventing and ameliorating hypertension. *Trends in Food Science & Technology*, 39: 104-115.
- Yang, J.H., Lin, H.C., Mau, J.L. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* 77(2): 229-235.
- Yu, Y., Hu, J., Miyaguchi, Y., Bai, X., Du, Y., Lin, B. 2006. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin. *Peptides*, 27(11): 2950-2956.
- Zheng, Z., Shetty, K. 2000. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochem.*, 35: 825-830.