

**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEREL MAYA KÜLTÜRLERİNİN ANJİYOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ  
ENZİM İNHİBİTÖRÜ ÜRETME POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Betül ORHAN**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Gıda Mühendisliği Programı**

**HAZİRAN 2019**



**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEREL MAYA KÜLTÜRLERİNİN ANJİYOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ  
ENZİM İNHİBİTÖRÜ ÜRETME POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Betül ORHAN  
(506151534)**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Gıda Mühendisliği Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER**

**HAZİRAN 2019**



İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506151534 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Betül ORHAN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “YEREL MAYA KÜLTÜRLERİNİN ANJİYOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM İNHİBİTÖRÜ ÜRETME POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :** **Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Öğr.Gör.Dr. Ayşegül MUTLU İNGÖK** .....  
Düzce Üniversitesi

**Teslim Tarihi** : **03 Mayıs 2019**  
**Savunma Tarihi** : **14 Haziran 2019**





*İnsanlığa,*





## ÖNSÖZ

Öncelikle tez çalışmamda hem bilgi ve deneyimi hem de emekleri ve samimi desteklerinden ötürü sevgili hocam Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER' e çok teşekkür ederim.

Özellikle laboratuvar çalışmalarım süresince ilgi, alaka ve yardımlarını esirgemeyen; pozitif yorumları ile beni sürekli teşvik eden Dr. Ceren DAŞKAYA DİKMEN' e ve her başım sıkıştığında bilgilerimi benimle paylaşan Dr. Ayşe SAYGÜN' e ve Yüksek Müh. Evren DEMİRCAN' a teşekkür ederim.

Aynı laboratuvarda omuz omuza ve desteklerimizi birbirimizden esirgmeden çalıştığımız canım arkadaşım Elif GÜNEŞLİ' ye çok teşekkür ederim.

Hiçbir zaman desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen özellikle annem Meltem ORHAN ve babam Mustafa Latif ORHAN' a ve tüm aileme her şey için teşekkür ederim.

Beni her zaman dinleyip, güçlü kalabilmemi sağlayan, her aşamamı anlatıp, heyecanımı paylaşabildiğim, stres dolu anlarımda beni rahatlatıp, en büyük motivasyon kaynağım olan hayat arkadaşım İlyas HATO' ya destekleri ve varlığı için çok teşekkür ederim.

Son olarak, son cümlesine kadar bu yazıyı okuma sabrı gösterip çalışmama ilgi duyarak tezimi incelemeye başladığınız için sizlere teşekkür ederim.

Tez çalışması İTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi MGA-2018-41746 nolu Mikrobiyal Kaynaklı Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü Eldesi projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Haziran 2019

Betül ORHAN  
(Gıda Mühendisi)



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ .....	vii
İÇİNDEKİLER .....	ix
KISALTMALAR .....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xxiii
ÖZET .....	xxv
SUMMARY .....	xxix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Tezin Amacı .....	3
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ .....</b>	<b>5</b>
2.1 Biyoaktif Peptitler .....	5
2.1.1 Biyoaktif peptit üretimi için gıda kaynakları .....	8
2.1.1.1 Hayvansal kaynaklı proteinler.....	8
2.1.1.2 Bitki kaynaklı proteinler .....	9
2.1.2 Biyoaktif peptit elde edilme yöntemleri.....	11
2.1.3 Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitör peptitler .....	13
2.1.3.1 ADE inhibitör peptitlerin yapısal özellikleri.....	15
2.1.3.2 ADE inhibitör peptitlerin etki mekanizması .....	17
2.1.3.3 ADE inhibitör peptit uygulamaları.....	19
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>21</b>
3.1 Materyal .....	21
3.1.1 Mikroorganizma kültürleri .....	21
3.1.2 Besiyeri ve çözeltiler .....	22
3.2 Metot .....	23
3.2.1 Maya izolatlarının geliştirilmesi .....	23
3.2.2 İzolatların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi .....	23
3.2.3 Mikrobiyal fermantasyon .....	24
3.2.4 ADE inhibitör aktivitesinin incelenmesi.....	25
3.3 İstatistiksel Analiz .....	26
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>27</b>
4.1 İzolatların Proteolitik Aktiviteleri .....	27
4.2 Süpernatantların ADE İnhibitör Aktivitesi .....	44
4.2.1 ADE inhibitör aktivitesinin değerlendirilmesi.....	45
4.3 İzolatların proteolitik aktiviteleri ile ADE inhibitör aktivitelerinin karşılaştırılması.....	46
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>53</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>55</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>73</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>103</b>



## KISALTMALAR

<b>A</b>	: Alanin
<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa
<b>ACE</b>	: Angiotensin Converting Enzyme
<b>ADE</b>	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
<b><math>\beta</math></b>	: Beta
<b>BAP</b>	: Biyoaktif Peptit
<b>C</b>	: Sistein
<b>D</b>	: Aspartik Asit
<b>dk</b>	: Dakika
<b>E</b>	: Glutamik Asit
<b>F</b>	: Fenilalanin
<b>FTS</b>	: Fizyolojik Tuzlu Su
<b>G</b>	: Glisin
<b>g</b>	: Göreceli Santrifüj Kuvveti
<b>g</b>	: Gram
<b>GIS</b>	: Gastrointestinal Sistem
<b>GRAS</b>	: Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen
<b>H</b>	: Histidin
<b>HD</b>	: Hidroliz Derecesi
<b>HHL</b>	: hippuril-L-histidiL-lösün
<b>HP</b>	: Yüksek basınç
<b>I</b>	: İzolösün
<b>K</b>	: Lizin
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>KVH</b>	: Kardiyovasküler Hastalıklar
<b>L</b>	: Lösün
<b>MCF</b>	: McFarland
<b>M</b>	: Metiyonin
<b><math>\mu</math>L</b>	: Mikrolitre
<b><math>\mu</math>M</b>	: Mikromolar
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>M</b>	: Molar
<b>N</b>	: Asparagin
<b>N</b>	: Normalite
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>nM</b>	: Nanomolar
<b>P</b>	: Prolin
<b>Q</b>	: Glutamin
<b>R</b>	: Arginin
<b>RAS</b>	: Renin-Anjiyotensin Sistemi
<b>rpm</b>	: Dakikada dönme sayısı ( <b>Revolutions Per Minute</b> )
<b>S</b>	: Serin

<b>SHR</b>	: Spontan Hipertansif Sıçanlar
<b>T</b>	: Trionin
<b>TSA</b>	: Tryptic Soy Agar
<b>TSB</b>	: Tryptic Soy Broth
<b>V</b>	: Valin
<b>W</b>	: Triptofan
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>Y</b>	: Tirozin



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

Çizelge 2.1 : ADE inhibitör peptit içeren bazı ticari ürünler. ....	20
Çizelge 3.1 : Maya İzolatları ve İzolasyon Kaynağı.....	21
Çizelge 3.2 : Maya İzolatları ve İzolasyon Kaynağı.....	22
Çizelge 3.3 : Yağsız süt içeren besiyeri kompozisyonu. ....	23
Çizelge 4.1 : Maya izolatlarının 15° C' deki proteolitik aktiviteleri. ....	30
Çizelge 4.2 : Maya izolatlarının 25° C' deki proteolitik aktiviteleri. ....	32
Çizelge 4.3 : Maya izolatlarının 35° C' deki proteolitik aktiviteleri. ....	33
Çizelge 4.4 : Mayaların proteaz üretimine sürenin etkisinin Duncan çoklu aralık testi ile incelenmesi. ....	41
Çizelge 4.5 : Mayaların proteaz üretimine sıcaklığın etkisinin Duncan çoklu aralık testi ile incelenmesi.....	42
Çizelge 4.6 : Pz indeksi değerlerine göre maya izolatlarının dağılımı. ....	43
Çizelge 4.7 : Maya izolatlarının ADE inhibisyon aktivitesi.....	44
Çizelge A.1 : <i>Cystofilobasidium</i> spp. B015-1 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	74
Çizelge A.2 : <i>Cystofilobasidium</i> spp. B015-1 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	74
Çizelge A.3 : <i>Cystofilobasidium</i> spp. B015-1 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	74
Çizelge A.4 : <i>Hanseniaspora</i> spp. SU-35 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	74
Çizelge A.5 : <i>Hanseniaspora</i> spp. SU-35 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	74
Çizelge A.6 : <i>Hanseniaspora</i> spp. SU-35 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	75
Çizelge A.7 : <i>Hanseniaspora</i> spp. SU-34 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	75
Çizelge A.8 : <i>Hanseniaspora</i> spp. SU-34 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	75
Çizelge A.9 : <i>Hanseniaspora</i> spp. SU-34 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	75

<b>Çizelge A.10</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SE-42 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	75
<b>Çizelge A.11</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SE-42 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	76
<b>Çizelge A.12</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SE-42 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	76
<b>Çizelge A.13</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SK-14 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	76
<b>Çizelge A.14</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SK-14 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	76
<b>Çizelge A.15</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SK-14 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	76
<b>Çizelge A.16</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SKI-38 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	77
<b>Çizelge A.17</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SKI-38 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	77
<b>Çizelge A.18</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SKI-38 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	77
<b>Çizelge A.19</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SU-4 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	77
<b>Çizelge A.20</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SU-4 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	77
<b>Çizelge A.21</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-21 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	78
<b>Çizelge A.22</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-21 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	78
<b>Çizelge A.23</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-21 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	78
<b>Çizelge A.24</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-12 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	78
<b>Çizelge A.25</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-12 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	78



<b>Çizelge A.26</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-12 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>79</b>
<b>Çizelge A.27</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-20 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>79</b>
<b>Çizelge A.28</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-20 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>79</b>
<b>Çizelge A.29</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-20 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>79</b>
<b>Çizelge A.30</b> : <i>Pichia</i> spp. SBY-7 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>79</b>
<b>Çizelge A.31</b> : <i>Pichia</i> spp. SBY-7 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>80</b>
<b>Çizelge A.32</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. B5-1 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>80</b>
<b>Çizelge A.33</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. B5-1 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>80</b>
<b>Çizelge A.34</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. B5-1 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>80</b>
<b>Çizelge A.35</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. BY-2 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>80</b>
<b>Çizelge A.36</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. BY-2 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>81</b>
<b>Çizelge A.37</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. BY-2 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>81</b>
<b>Çizelge A.38</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. BY-9 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>81</b>
<b>Çizelge A.39</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. BY-9 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>81</b>
<b>Çizelge A.40</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. BY-9 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>82</b>
<b>Çizelge A.41</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B010 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>82</b>

<b>Çizelge A.42</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B010 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>82</b>
<b>Çizelge A.43</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B010 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>82</b>
<b>Çizelge A.44</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B013-2 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>82</b>
<b>Çizelge A.45</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B013-2 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>83</b>
<b>Çizelge A.46</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B013-2 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>83</b>
<b>Çizelge A.47</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B015-2 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>83</b>
<b>Çizelge A.48</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B015-2 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>83</b>
<b>Çizelge A.49</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B015-2 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>83</b>
<b>Çizelge A.50</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B04 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>84</b>
<b>Çizelge A.51</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B04 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>84</b>
<b>Çizelge A.52</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B04 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>84</b>
<b>Çizelge A.53</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B514-1 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>84</b>
<b>Çizelge A.54</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B514-1 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>84</b>
<b>Çizelge A.55</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B514-1 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>85</b>
<b>Çizelge A.56</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B514-2 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>85</b>
<b>Çizelge A.57</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B514-2 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>85</b>

<b>Çizelge A.58</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B514-2 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>85</b>
<b>Çizelge A.59</b> : <i>Cystofilobasidium</i> spp. B015-1 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>85</b>
<b>Çizelge A.60</b> : <i>Cystofilobasidium</i> spp. B015-1 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>86</b>
<b>Çizelge A.61</b> : <i>Cystofilobasidium</i> spp. B015-1 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>86</b>
<b>Çizelge A.62</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SU-35 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>86</b>
<b>Çizelge A.63</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SU-35 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>86</b>
<b>Çizelge A.64</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SU-35 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>86</b>
<b>Çizelge A.65</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SU-34 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>87</b>
<b>Çizelge A.66</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SU-34 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>87</b>
<b>Çizelge A.67</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SE-42 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>87</b>
<b>Çizelge A.68</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SE-42 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>87</b>
<b>Çizelge A.69</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SE-42 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>87</b>
<b>Çizelge A.70</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SK-14 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>88</b>
<b>Çizelge A.71</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SK-14 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>88</b>
<b>Çizelge A.72</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SK-14 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>88</b>
<b>Çizelge A.73</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SKI-38 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>88</b>

<b>Çizelge A.74</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SKI-38 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>88</b>
<b>Çizelge A.75</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SU-4 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>89</b>
<b>Çizelge A.76</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SU-4 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>89</b>
<b>Çizelge A.77</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-21 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>89</b>
<b>Çizelge A.78</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SB-29 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>89</b>
<b>Çizelge A.79</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-21 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>89</b>
<b>Çizelge A.80</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-12 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>90</b>
<b>Çizelge A.81</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-12 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>90</b>
<b>Çizelge A.82</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-12 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>90</b>
<b>Çizelge A.83</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-20 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>90</b>
<b>Çizelge A.84</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-20 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>90</b>
<b>Çizelge A.85</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-20 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>91</b>
<b>Çizelge A.86</b> : <i>Pichia</i> spp. SBY-7 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>91</b>
<b>Çizelge A.87</b> : <i>Pichia</i> spp. SBY-7 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>91</b>
<b>Çizelge A.88</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. B5-1 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>91</b>
<b>Çizelge A.89</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. B5-1 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>91</b>

<b>Çizelge A.90</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. B5-1 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>92</b>
<b>Çizelge A.91</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. BY-2 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>92</b>
<b>Çizelge A.92</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. BY-2 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>92</b>
<b>Çizelge A.93</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. BY-2 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>92</b>
<b>Çizelge A.94</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. BY-9 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>93</b>
<b>Çizelge A.95</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. BY-9 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>93</b>
<b>Çizelge A.96</b> : <i>Rhodospiridiobolus</i> spp. BY-9 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>93</b>
<b>Çizelge A.97</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B010 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>93</b>
<b>Çizelge A.98</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B010 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>93</b>
<b>Çizelge A.99</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B013-2 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>94</b>
<b>Çizelge A.100</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B013-2 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>94</b>
<b>Çizelge A.101</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B013-2 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>94</b>
<b>Çizelge A.102</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B015-2 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>94</b>
<b>Çizelge A.103</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B015-2 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>94</b>
<b>Çizelge A.104</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B04 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>95</b>
<b>Çizelge A.105</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B04 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi. ....	<b>95</b>

<b>Çizelge A.106</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B514-1 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>95</b>
<b>Çizelge A.107</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B514-1 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>95</b>
<b>Çizelge A.108</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B514-1 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>95</b>
<b>Çizelge A.109</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B514-2 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>96</b>
<b>Çizelge A.110</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B514-2 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>96</b>
<b>Çizelge A.111</b> : 15°C inkübasyon sıcaklığında 24 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>96</b>
<b>Çizelge A.112</b> : 15°C inkübasyon sıcaklığında 48 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>96</b>
<b>Çizelge A.113</b> : 15°C inkübasyon sıcaklığında 72 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>97</b>
<b>Çizelge A.114</b> : 25°C inkübasyon sıcaklığında 24 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>97</b>
<b>Çizelge A.115</b> : 25°C inkübasyon sıcaklığında 48 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>97</b>
<b>Çizelge A.116</b> : 25°C inkübasyon sıcaklığında 72 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>97</b>
<b>Çizelge A.117</b> : 35°C inkübasyon sıcaklığında 24 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>98</b>
<b>Çizelge A.118</b> : 35°C inkübasyon sıcaklığında 48 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>98</b>
<b>Çizelge A.119</b> : 35°C inkübasyon sıcaklığında 72 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>98</b>
<b>Çizelge A.120</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B013-2 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>98</b>
<b>Çizelge A.121</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B010 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>99</b>
<b>Çizelge A.122</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B514-1 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>99</b>
<b>Çizelge A.123</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B514-2 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>99</b>

<b>Çizelge A.124</b> : <i>Cystofilobasidium</i> spp. B015-1 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>99</b>
<b>Çizelge A.125</b> : <i>Rhodospordiobolus</i> spp. BY9 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>99</b>
<b>Çizelge A.126</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SU-4 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>100</b>
<b>Çizelge A.127</b> : <i>Rhodospordiobolus</i> spp. B5-1 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>100</b>
<b>Çizelge A.128</b> : <i>Metschnikowia</i> spp. SK-20 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>100</b>
<b>Çizelge A.129</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SK-14 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>100</b>
<b>Çizelge A.130</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SE-42 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>100</b>
<b>Çizelge A.131</b> : <i>Yamadazyma</i> spp. B04 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>101</b>
<b>Çizelge A.132</b> : <i>Hanseniaspora</i> spp. SU-34 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.....	<b>101</b>





## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

- Şekil 2.1** : İnsan sağlığının teşviki ve hastalığın önlenmesi ile ilgili gıda proteini kaynaklı peptitlerin biyoaktif özellikleri. .... 6
- Şekil 2.2** : ADE inhibitörlerinin yapısı; Kaptopril ve Lisinopril. .... 14
- Şekil 2.3** : ADE' nin kristal yapısı. .... 15
- Şekil 2.4** : Biyoaktif peptitler için moleküler hedefleri (renin ve anjiyotensin-dönüştürücü enzim) gösteren kan basıncını düzenleyen renin-anjiyotensin sistemi yolu. .... 18
- Şekil 4.1** : *Metschnikowia* spp. SK-21 izolatının 25°C' deki 24, 48 ve 72 saatteki koloni çapı ve koloni çapı ile hidroliz zon toplam çapının görselleri. .... 27
- Şekil 4.2** : *Cystofilobasidium* spp. B015-1 izolatının 25°C' deki 24, 48 ve 72 saatteki koloni çapı ve koloni çapı ile hidroliz zon toplam çapının görselleri. .... 28
- Şekil 4.3** : *Metschnikowia* spp. SK-20 izolatının 25°C' deki 24, 48 ve 72 saatteki koloni çapı ve koloni çapı ile hidroliz zon toplam çapının görselleri. .... 28
- Şekil 4.4** : *Yamadazyma* spp.'lerinin proteolitik aktiviteleri. .... 35
- Şekil 4.5** : *Hanseniaspora* spp.'lerinin proteolitik aktiviteleri. .... 36
- Şekil 4.6** : *Metschnikowia* spp.'lerinin proteolitik aktiviteleri. .... 38
- Şekil 4.7** : *Cystofilobasidium* spp. ; *Pichia* spp. ; *Rhodospordiobolus* spp.'lerinin proteolitik aktiviteleri. .... 40
- Şekil 4.8** : Seçilen maya izolatlarının 24 saat Pz indeks ve ADE inhibisyon aktiviteleri karşılaştırması. .... 47
- Şekil 4.9** : Seçilen maya izolatlarının 48 saat Pz indeks ve ADE inhibisyon aktiviteleri karşılaştırması. .... 48



## YEREL MAYA KÜLTÜRLERİNİN ANJİYOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM İNHİBİTÖRÜ ÜRETME POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ

### ÖZET

Biyoaktif peptitler, vücut fonksiyonları üzerinde olumlu etkilere sahip olan, gıdalarda doğal olarak bulunan proteinlerden çeşitli yöntemlerle elde edilen, sağlığı etkileyebilecek spesifik peptitler olarak tanımlanmaktadır. Biyoaktif peptitler, nörotransmitterler, hormonlar veya antibiyotikler gibi davranabildiğinden, spesifik reseptörlerle bağlanarak ve hücrelerle etkileşime girerek fizyolojik fonksiyonları pozitif olarak değiştirebilirler.

Antihipertansif peptitler arasında, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) peptitlerinin kan basıncını düşürdüğü bildirilmiştir. Anjiyotensin dönüştürücü enzimin, kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. Renin-anjiyotensin sistemi içerisinde ADE, güçlü bir vazokonstriktör olan Anjiyotensin I'den Anjiyotensin II'ye dönüşümünü katalize eder. Bununla birlikte, ADE vazodilatatör özelliklere sahip bradikinini hidrolize etme özelliğine sahiptir.

Protein sekansları içinde etkisiz olan bu peptitler, sindirim enzimleriyle hidroliz yoluyla, proteolitik mikroorganizmalar tarafından hidroliz yoluyla ve mikroorganizma ya da bitki kaynaklı proteolitik enzimlerin etkisiyle aktif hale getirilerek elde edilebilmektedir.

Fermente sütler kolayca sindirilebilir olmanın yanı sıra sağlık üzerinde olumlu etkileri olan fonksiyonel bileşiklerin bir kaynağıdır. Geleneksel fermente sütlerde ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının tek kültür olarak ya da kültür kombinasyonu ile fermente edilen sütlerde ADE aktivitesi bildirilmiştir. Bununla birlikte, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida parapsilosis* gibi bazı maya türlerinde ADE aktivitesine sahip peptitlerin üretimi bildirilmiştir. Aynı zamanda mayaların patojen olmamaları ve genel olarak güvenilir olduğu kabul edilen (GRAS) maddeler statüsünde olmaları nedeniyle peptit elde edilmesinde kullanımları tercih edilmektedir.

ADE inhibisyonuna sahip antihipertansif ilaçların kullanımıyla öksürük, alerji, tat bozuklukları ve cilt değişiklikleri gibi oluşan olumsuz yan etkilerden dolayı, gıda proteini kaynaklı peptitlerin uygun alternatifler olarak geliştirilmesine yönelik çabalar artmıştır.

Maya ve bakteriler tarafından mikrobiyal fermantasyonla da üretilebilen bu peptitler düşük maliyetleri, kolay üretilmeleri ve yüksek aktiviteleri nedeniyle tercih edilmektedir. Biyoaktif peptitlerin fonksiyonel özellikleri ve sağlık yararları göz önünde bulundurulduğunda literatür çalışmaları, piyasada bulunan sentetik ADE

inhibe edici ilaçlara alternatif doğal kaynaklardan elde edilebilecek bileşenlerin keşfine odaklanmıştır.

Yapılan tez çalışmasında Türkiye’den çeşitli bitki, meyve ve geleneksel fermente gıda maddelerinden izole edilmiş olan farklı maya izolatlarının farklı sıcaklık ve sürelerde proteaz üretme potansiyelleri ve seçilen kültürlerin yağsız süt ortamında ADE inhibitör peptit üretme potansiyelleri spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Çalışmada *Yamadazyma* spp. (6 izolat), *Cystofilobasidium capitatum* (1 izolat), *Rhodospiridiobolus colostri* (3 izolat), *Hanseniaspora uvarum* (7 izolat), *Metschnikowia* spp. (8 izolat), *Pichia* spp. (2 izolat) izolatları sıvı besiyerinde çoğaltılmış ve ilk aşamada proteolitik aktivitelerinin incelenmesi amacıyla yağsız süt içeren bazal besiyerine tek nokta ekim yöntemiyle ekim yapılarak 15°C, 25°C ve 35°C’ de 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda, koloni ve hidroliz zon çapı ölçülmüştür. Proteaz aktivitesi, koloni çapının (KÇ) koloni çapı ve çökeltme bölgesi toplamına (KÇ+HZ) bölünmesiyle hesaplanan Pz indeks değerleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Pz indeks değerlerine göre izolatların proteolitik aktivitesi,  $Pz < 0,40$  yüksek,  $0,41 < Pz < 0,60$  orta,  $0,61 < Pz < 0,80$  ise düşük,  $0,81 < Pz < 0,99$  çok düşük,  $Pz = 1$  ise aktivite yok şeklinde belirlenmiştir.

Çalışmada 15°C’de 24 saat inkübasyon sonucunda izolatların %51,9’unda proteolitik aktivite tespit edilmemiştir. İnkübasyon süresindeki artışla birlikte proteolitik aktivite de artış gözlenmiştir. En yüksek proteolitik aktivite ( $Pz = 0,37$ ), 72 saat inkübasyon sonucunda *Yamadazyma* spp. B015-2 izolatında saptanmıştır. 25°C’de 24 saat inkübasyon sonucunda izolatların %37 sinin düşük; %33,3 ünün proteolitik aktivite göstermediği ve orta proteolitik aktivite değerine sahip 1 adet izolatın bulunduğu belirlenmiştir. İnkübasyon süresi arttıkça proteolitik aktivite artış göstermiş 72 saat inkübasyon sonucunda izolatların %37 sinin orta proteolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. 25°C ‘de 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda en yüksek proteolitik aktiviteye sahip izolatlar sırasıyla *Yamadazyma* spp. B514-2 ve *Hanseniaspora* spp. SE-42’dir. 35°C’de de en yüksek proteolitik aktivite *Yamadazyma* spp. B514-2 izolatında tespit edilmiştir. Ancak *Yamadazyma* spp. B514-2 izolatı, 25°C’de daha yüksek proteolitik aktivite göstermiştir. *Yamadazyma* spp. B514-2 izolatının 25°’de 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda Pz indeks değerleri sırasıyla 0,33 ve 0,20, 35°C için her iki inkübasyon süresi için 0,30 olarak belirlenmiştir.

İnkübasyon süresinin artmasına bağlı olarak farklı sıcaklık değerlerinin her birinde izolatların proteolitik aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir. Mayaların 25°C sıcaklığında 24 saat inkübasyon sonucundaki Pz indeks aktiviteleri 0,60–1 aralığında değişmekteyken; 48 saat inkübasyon sonucunda 0,33–1 aralığında; 72 saat inkübasyon sonucunda ise 0,20–1 arasında proteolitik aktiviteleri değişmektedir. Mayaların proteaz üretimine inkübasyon süresinin etkisi, her izolat için her inkübasyon sıcaklığında ayrı ayrı Duncan çoklu aralık testi ile incelenmiş ve sıcaklığın etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Ayrıca inkübasyon sıcaklığının proteaz üretimine etkisinin izolatlara göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Farklı inkübasyon sıcaklıklarında gözlemlenen sonuçlar birbirleriyle karşılaştırıldığında 25°C sıcaklıkta gelişen suşların daha fazla proteolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş ve çalışmanın ikinci aşamasında 25°C’de inkübasyon sıcaklığında ve 24, 48 saat ADE inhibitör aktivitesi incelenmiştir.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında, farklı proteolitik aktiviteye sahip 13 izolat seçilerek mikrobiyal fermantasyon ile ADE inhibitör etkisinin incelenmesi ve ADE inhibitör üreticisi kültürler belirlenmiştir.

ADE inhibitör peptit üretimi için protein kaynağı olarak yağsız süt kullanılmıştır. Ön inkübasyonla geliştirilen izolatlar yağsız sütte 25° C’de 150 rpm karıştırma hızında 24 ve 48 saat süresince geliştirildikten sonra 10000 g, 4°C ve 10 dk santrifüjle süpernatant ve pellet kısımları ayrılmıştır. Elde edilen süpernatantlar daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere steril viallere alınarak -40°C’ de saklanmıştır.

Mikrobiyal fermantasyon ile elde edilen süpernatantların ADE inhibitör aktivitesi; inhibitör madde varlığında ADE çalışmasının engellenmesi sonucunda hippuril-L-histidil-lösin (HHL) substratının hippürik aside dönüşümünün önlenmesi prensibine dayanan yöntemle tespit edilmiştir. Oluşan hippürik asit miktarı spektrofotometrik yöntem aracılığıyla değerlendirilmiştir.

Hidroliz süresindeki artışa bağlı olarak hidrolizatların çoğunluğunda ADE inhibitor aktivitelerinin azaldığı görülmüştür. SE-42, SK-14, SU-4 ve B010 izolatlarında ise ADE inhibisyon aktivitelerinde zamana bağlı artış olduğu gözlenmiştir. 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda ise farklı mayaların istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. ADE inhibitör aktiviteye sahip olduğu tespit edilen suşların inhibisyon değerleri % 8,60 - % 36,12 arasında değişmektedir. 24 saat inkübasyon sonucunda ADE inhibisyon aktivitesi en yüksek olan izolatın B514-1 izolatı olduğu görülmüştür. 48 saat inkübasyon sonucunda ise B010 kodlu izolatın en yüksek ADE aktivitesi gösterdiği sonucu elde edilmiştir.

Son olarak 13 farklı maya izolatının 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen ADE inhibisyon aktiviteleri ve Pz indeks değerleri karşılaştırılmıştır. 24 saat inkübasyon süresi sonunda yüksek ADE inhibitör aktivite gözlemlenen B514-1 numaralı *Yamadazyma* spp. izolatının Pz indeks değerinin 0,95 olduğu görülmüştür. Aynı inkübasyon koşullarında en yüksek proteolitik aktiviteye sahip izolatın ise 0,59 Pz indeks değeriyle B015-1 *Cystofilobasidium* spp. izolatı olduğu ve ADE inhibitör aktivitesinin ise % 20,77 olduğu belirlenmiştir. En düşük ADE inhibitör aktivitesine sahip izolat ise SK-14 kodlu *Hanseniaspora* spp. olup Pz indeksi 0,64’tür.

Aynı şekilde 13 farklı maya izolatının 48 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen ADE inhibisyon aktiviteleri ve Pz indeks değerleri de karşılaştırılmıştır. 48 saat inkübasyon süresi sonunda en yüksek ADE inhibitör aktivitesi gösteren izolatın B010 *Yamadazyma* spp. olduğu ve Pz indeksinin 0,60 olduğu görülmüştür. Aynı inkübasyon koşullarında en yüksek proteolitik aktiviteye sahip izolatın ise 0,33 Pz indeks değeriyle B514-2 *Yamadazyma* spp. izolatı olduğu ve ADE inhibitör aktivitesinin ise % 14,29 olduğu görülmüştür. En düşük ADE aktivitesine sahip izolat ise B5-1 kodlu *Rhodospordiobolus* spp. olup Pz indeksi 0,58’dir.



## INVESTIGATION OF THE PRODUCTION POTENTIALS OF THE ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITOR ON LOCAL YEAST CULTURES

### SUMMARY

Bioactive peptides which have many effects on health such as opioid, antihypertensive, antimicrobial are among the prominent issues in this field. Bioactive peptides are defined as specific peptide fragments, which have positive effects on body functions, can be effected by various methods from naturally occurring proteins in foods and can affect health. Bioactive peptides can act as neurotransmitters, hormones or antibiotics. Thus, they could alter physiological functions by binding to specific receptors and interacting with the cells.

Among antihypertensive peptides, angiotensin converting enzyme (ACE) peptides have been reported to decrease blood pressure. It is well known that the angiotensin converting enzyme plays an important role in adjustment blood pressure. In the renin-angiotensin system, ACE which is a potent vasoconstrictor catalyzes the conversion of Angiotensin I to Angiotensin II. However, ACE has the ability to hydrolyze bradykinin with vasodilator properties.

These peptides, which are ineffective in protein sequences, can be obtained by hydrolysis with digestive enzymes and proteolytic microorganisms and by activation of the microorganism or plant-derived proteolytic enzymes.

In addition to being easily digestible, fermented milk is a source of functional compounds with positive effects on health. ACE activity has been reported in traditional fermented milk and milk fermented with a culture or cultures combinations of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus acid*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains. In addition to this, production of peptides having ADE activity in some yeast species such as *K. marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida parapsilosis* has been reported. At the same time, yeasts are not pathogenic and in generally recognized as safe (GRAS) status therefore they are preferred in obtaining the peptide.

Efforts to develop food protein-derived peptides as suitable alternative have increased due to the side effects of antihypertensive drugs having ACE inhibition such as cough, allergy, taste disorders and changes observed on skin.

These peptides, which can be produced by microbial fermentation by yeast and bacteria, are preferred because of their low costs, easy production and high activity. In view of the functional properties and health benefits of bioactive peptides, literature studies have focused on the discovery of components that can be obtained from alternative natural sources for commercially available synthetic ADE inhibitor drugs.

In the first stage of the thesis, protease producing potentials at different temperatures and incubation times of different yeast isolates obtained from various plants, fruit and traditional fermented foods in Turkey and ACE inhibitory peptide generation potentials in non-fat milk medium of selected cultures were examined spectrophotometrically. In the study, *Yamadazyma* spp. (6 isolates), *Cystofilobasidium capitatum* (1 isolate), *Rhodospiridiobolus colostri* (3 isolates), *Hanseniaspora uvarum* (7 isolates), *Metschnikowia* spp. (8 isolates), *Pichia* spp. (2 isolates) isolates were grown in liquid medium and it was cultured with single point sowing method to basal medium including skimmed milk for examining proteolytic activities. They were incubated at 15°C, 25°C and 35°C for 24, 48 and 72 hours. At the end of the incubation, colony and hydrolysis zone diameters were measured. Protease activity (Pz index value) was calculated by the ratio of colony diameter to total colony diameter and sedimentation region. Results were evaluated according to activity ranges used by Galán-Ladero et al. (2010). Ranges of activity according to Pz index were specified: high, Pz<0.40; medium, Pz=0.41–0.60; low, Pz=0.61–0.80; very low, Pz=0.81–0.99; none, Pz =1.

In this study, proteolytic activity was not detected in 51.9% of isolates after 24 hours incubation at 15°C. Proteolytic activity increased with increasing incubation time. The highest proteolytic activity (Pz = 0.37) was obtained by 72 hours incubation with *Yamadazyma* spp. B015-2. Incubation at 25°C for 24 hours resulted in low activity for 37% of the isolates. Also, it was found that 33.3% of the isolates did not show proteolytic activity and there was one isolate with medium proteolytic activity value. After 72 hours incubation, 37% of the isolates showed medium proteolytic activity. The isolates with the highest proteolytic activity after incubation at 25°C for 48 and 72 hours were *Yamadazyma* spp. B514-2 and *Hanseniaspora* spp. SE-42, respectively. At 35°C, the highest proteolytic activity was detected in *Yamadazyma* spp. B514-2 isolate. However, the isolate of *Yamadazyma* spp. B514-2 showed higher proteolytic activity at 25°C. As a result of 48 and 72 hours incubation at 25°C, Pz index values of the *Yamadazyma* spp. B514-2 isolate were determined as 0.33 and 0.20, respectively and 0.30 for both incubation times at 35°C.

It was observed that the proteolytic activities of the isolates increased in each of the different temperature value due to the increase of incubation time. Pz index activities of yeasts after 24, 48 and 72 hours incubation at 25°C were found in the range of 0.60 - 1; 0.33 - 1; 0.20 - 1, respectively. The effect of incubation time on the protease production of yeasts was investigated by Duncan multiple interval test at each incubation temperature for each isolate and the effect of temperature was statistically significant ( $p < 0.05$ ). In addition, it was found that the effect of incubation temperature on protease production demonstrate difference according to the isolates.

When the observed results at different incubation temperatures were compared with each other, it was determined that the strains incubated at 25°C had more proteolytic activity and therefore in the second stage of the study, ACE inhibitory activity were examined at 25°C incubation temperature for 24 and 48 hours.

In the second part of the thesis, 13 isolates with different proteolytic activity were selected and the ACE inhibitor effect by microbial fermentation and ACE inhibitor producer cultures were determined.

Skimmed milk was used as protein source for ACE inhibitor peptide production. The isolates developed by pre-incubation were developed in skimmed milk at 25°C at a stirring speed of 150 rpm for 24 and 48 hours, and the supernatant and pellet fractions were separated by centrifugation at 10000 g, 4°C and 10 minutes. The obtained supernatants were transferred to sterile vials for further analysis and stored at -40°C.



ACE inhibitor activity of the supernatants obtained with microbial fermentation was determined with principle of inhibition of the conversion of hippuril-L-histidyl-L-leucine (HHL) substrate to hippuric acid in consequence of ACE activity inhibition in the presence of inhibitory substance. The amount of hippuric acid was evaluated by spectrophotometric method.

It was observed that ACE inhibitor activities decreased in the majority of hydrolysates due to the increase in hydrolysis time. SE-42, SK-14, SU-4 and B010 isolates showed a time-dependent increase in ACE inhibition activities. As a result of 24 and 48 hours incubation, it was concluded that different yeasts were statistically different from each other. Inhibition values of strains detected to have ACE inhibitory activity were ranged from 8.60% to 36.12%. After 24 hours incubation, B514-1 isolates had the highest ACE inhibition activity. At the end of 48 hours incubation, B010 coded isolate showed the highest ACE activity.

Finally, ACE inhibition activities and Pz index values obtained after 24 hours incubation of 13 different yeast isolates were compared. At the end of the 24 hour incubation period, the Pz index value of *Yamadazyma* spp. isolate (isolate number B514-1) with highest ACE inhibitory activity was 0.95. B015-1 *Cystophilobacidium* spp. isolate had the highest proteolytic activity with 0.59 Pz index value under the same incubation conditions and ACE inhibitory activity was found 20.77%. The isolates with the lowest ACE inhibitory activity were SK-14 coded *Hanseniaspora* spp. and Pz index was 0.64.

Likewise, ACE inhibition activities and Pz index values obtained by incubation of 13 different yeast isolates for 48 hours were compared. At the end of the 48 hours incubation period, the highest ACE inhibitor activity was B010 *Yamadazyma* spp. and Pz index was 0.60. B514-2 *Yamadazyma* spp. isolate had the highest proteolytic activity under the same incubation conditions with 0.33 Pz index value of and ACE inhibitory activity was 14.29%. The isolate with the lowest ACE activity was *Rhodospordiobolus* spp. with B5-1 code and Pz index was 0.58.



## 1. GİRİŞ

Günümüzde, diyabet, obezite, oksidatif stres, kanser, kardiyovasküler hastalıklar (KVH) ve ağır enfeksiyonlar gibi çok sayıda hastalıklar, fizyolojik ve morfolojik bozukluklar yaşam kalitesini etkilemektedir. Bu bozuklukların birçoğu sentetik katkı maddelerinin kötüye kullanımı, dengesiz diyetler, radyasyona maruz kalma ve güçlü virüslerle ilişkilidir (Saadi ve diğ., 2015). Bu nedenle, son on yıl içerisinde, dejeneratif hastalıklarla savaşabilecek yeni ilaçlar ve fonksiyonel gıda ürünlerinin araştırılması ve geliştirilmesine yönelik çalışmalar artmıştır. Doğal kaynaklar bu bağlamda özellikle dikkat çekmektedir. Bu yeni ürünlerin bazıları, yeni ilaçlar, nutrasötikler ve fonksiyonel gıda bileşenlerinin keşfedilmesinde olağanüstü avantajlara ve biyolojik etkinliklere sahip olan peptitler gibi küçük moleküllerdir (Badiani, 2002; Newman & Cragg, 2007; Newman & Cragg, 2012; Uhlig ve diğ., 2014; Nooshkam & Madadlou, 2016). Biyoaktif peptitler, enzimatik hidroliz tarafından üretilen ve kan akışına ulaşmak için bağırsak enterositler tarafından absorbe edilen, vücut fonksiyonları ve koşulları üzerinde yararlı biyolojik aktivite uygulayan kısa zincirli peptitlerdir (Sayari ve diğ., 2016; Wang ve diğ., 2016). Biyoaktif peptitler, genellikle molekül başına 2 ile 20 amino asit içerir, ancak bazı durumlarda 20'den fazla amino asitten oluşabilir (Erdmann ve diğ., 2008). Amino asitlerin dizilimine bağlı olarak, bu peptitler, mineral bağlanma, immünomodülatör, antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik, hipokolesterolemik ve antihipertansif etkiler dahil olmak üzere çeşitli aktiviteler gösterebilmektedirler (Coscueta ve diğ., 2016).

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, kardiyovasküler hastalıklar dünya üzerindeki ölüm nedenleri arasında en üst sırada yer almaktadır (WHO, 2014). Beslenme, damar tıkanıklığı, koroner kalp hastalığı, felç ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıkların (KVH) önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Iwaniak ve diğ., 2014; Boschin ve diğ., 2014; Hanafi ve diğ., 2018). Kardiyovasküler hastalıkların en önemli risk faktörü, kan damarlarında sürekli yüksek basınç ile kendini gösteren bir durum olan hipertansiyondur. Tansiyon ilaçları, özellikle de anjiyotensin-I-

dönüştürücü enzimin (ADE) inhibitörleri renin-anjiyotensin sistemindeki kan basıncını düzenlemek için kullanılır (Boschin ve diğ., 2014).

ADE, aktif hipertansif hormon anjiyotensin II'nin inaktif prohormon anjiyotensin I'den üretilmesinde bir katalizördür ve bir vazodilatör olan bradikinin parçalanmasında rol oynar (Jang ve diğ., 2011; Daskaya-Dikmen ve diğ., 2017). Aktif hipertansif bradikinin, bradikininojenden oluşur ve kinaz II'nin hareketleri vasıtasıyla aktif olmayan fragmanlara dönüşür. Bu şekilde, sabit kan basıncı, hipertansif peptit, anjiyotensin II ve hipotansif peptit bradikinin tarafından korunur (Jang ve diğ., 2011). ADE'nin kan basıncının düzenlenmesindeki önemli rolleri nedeniyle, bu enzimin inhibisyonu hipertansiyon tedavisinde (Coppey ve diğ., 2006) kullanılmıştır. Captopril, benzapril, enalapril, fosinopril ve lisinopril gibi ADE inhibe edici ilaçların ve doğal ADE inhibe edici peptitlerin, antihipertansif etki gösterdikleri bildirilmiştir (Lee & Hur, 2017).

İlaçların etkinliğinin yanı sıra kuru öksürük, tat bozuklukları ve uzun süreli kullanımdan kaynaklanan deri döküntüleri bu inhibitörlerin bazı yan etkileri olarak bildirilmiştir (Cheung ve diğ., 2009; Gu & Wu, 2013). Bu nedenle, son yıllardaki çalışmalar bitki özleri gibi biyolojik kaynaklara yönelmiştir.

Biyoaktif peptitler, amino asit sekansına bağlı olarak, kardiyovasküler, sindirim, bağışıklık ve sinir sistemlerini etkileyebilir. Bu nedenle, farklı diyet peptit sekanslarının, kronik hastalık riskini azaltarak veya doğal bağışıklık korumasını artırarak insan sağlığını geliştirme potansiyeli son yıllarda bilimsel araştırmalarda artışa neden olmuştur. Bu faydalı sağlık etkileri, örneğin antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik, antihipertansif ve immünomodülatör aktiviteler bilinen birçok peptit sekansına bağlanabilir (Fitzgerald & Meisel, 2003; Shimizu, 2004).

Günümüzde, süt proteinleri, biyoaktif peptitlerin en önemli kaynağı olarak kabul edilmektedir ve süt protein hidrolizatlarında ve fermente süt ürünlerinde birçok biyoaktif peptit tanımlanmıştır (Schanbacher ve diğ., 1998; Meisel, 1998; Clare & Swaisgood, 2000; Kilara & Panyam, 2003; Meisel, 2004; FitzGerald ve diğ., 2004; Silva & Malcata, 2005; Korhonen & Pihlanto, 2007).

Biyoaktif peptitlerin içerisinde yer alan ADE inhibitör peptitlerin elde edilmesinde pek çok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında mikrobiyal proteaz

aracılığıyla süt proteinlerinden ADE inhibe edici peptitlerin varlığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

### **1.1 Tezin Amacı**

Liteartrde yapılan çalışmalar bitkisel ve hayvansal kaynakların yanı sıra mikrobiyal kaynaklardan da fonksiyonel bileşenler elde edildiğini göstermektedir. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) inhibitörü peptit içeren fermente sütler proteaz aktivitesine sahip laktik asit bakterisi veya mayalar kullanılarak üretilmektedir. Biyoaktif zellik gösteren farklı bileşenler mikroorganizmalar ile hızlı, kolay, ucuz, toksik olmayan ve modern tekniklerle üretilmektedir. Yapılan tez çalışması ile ADE inhibitörü bileşenlerin yararlı mikroorganizmalarca üretilme potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmalarla ADE inhibitörü metabolit üreticisi suşlar ve ADE inhibitor aktivitelerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Yüksek lisans tezi kapsamında yapılan çalışmaların temel amacı;

- Türkiye’ den toplanan çeşitli bitki, meyve ve geleneksel fermente gıda maddelerinden izole edilerek tanımlanmış soğukta aktif ve mezofilik maya izolatlarının proteolitik aktivitelerinin değerlendirilmesi,
- Yüksek proteolitik aktiviteye sahip suşların Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) inhibitör etkisinin incelenmesi ile ADE inhibitör metabolit üreticisi kültürlerin belirlenmesidir.

Tez alışması kapsamında yapılan çalışmaların ilk aşamasında kültürler proteolitik aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Sonraki aşamada ise, seçilen kültürlerin protein kaynağı olarak yağsız sütün kullanıldığı besiyeri ortamında ürettiği metabolitlerin ADE inhibitör etkinliği spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.



## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Biyoaktif Peptitler

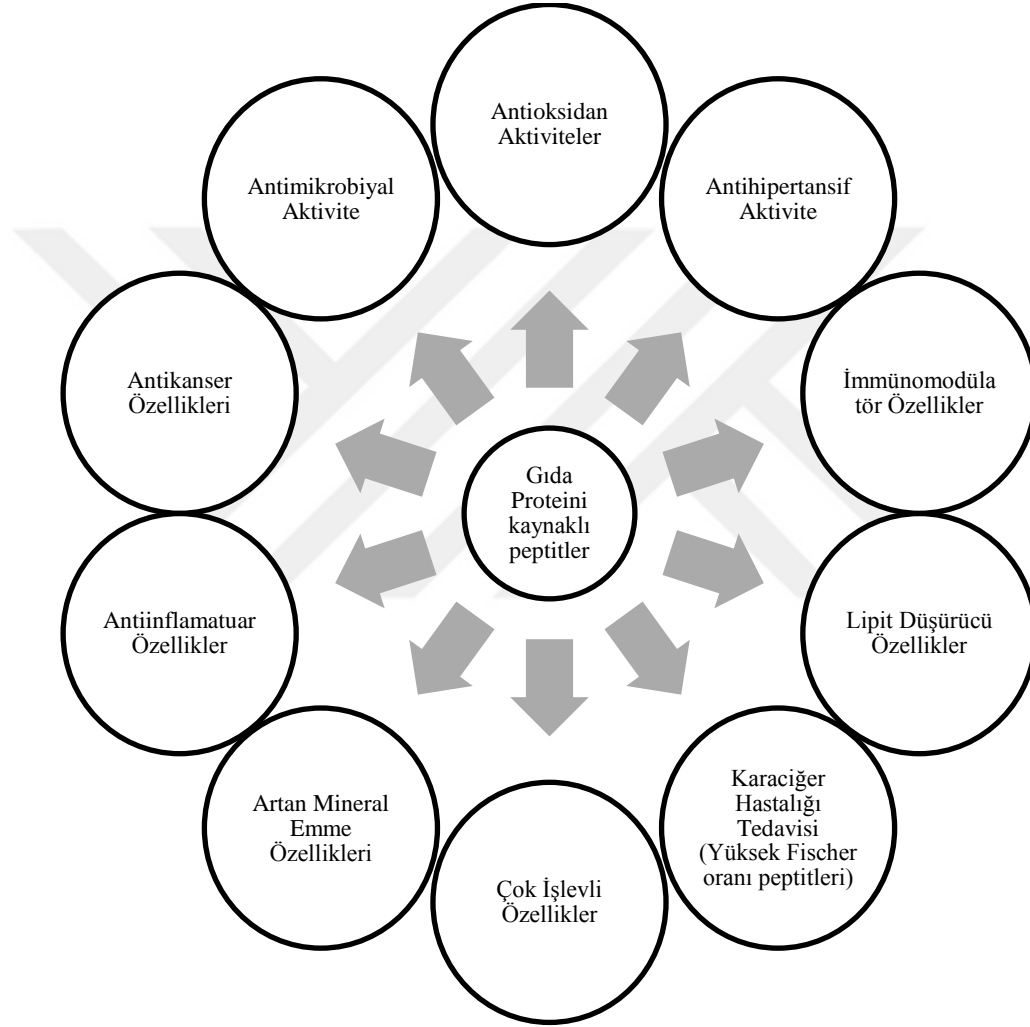
Biyoaktif peptitlerin ilk kez 1950' de Mellander tarafından kullanıldığı bildirilmiştir. Mellander kazeinden türetilen fosforlanmış yapıya sahip bir dizi peptitin, bebeklerde kalsifikasyonu destekleyebileceğini öne sürmüştür ve bu konuda çok fazla bilgi toplanmıştır (Martínez-Medina ve diğ., 2019). Biyoaktif peptitler insan vücut fonksiyonlarına pozitif bir etki sağlayan ve fizyolojik etkileri bildirilen protein kaynaklı biyomoleküllerdir (Martínez-Medina ve diğ., 2018; Arshad ve diğ., 2019). Peptitler, amino asitlerden oluşan proteinlere benzer, ancak proteinlerden daha az sayıda amino aside sahip olmaları bakımından farklılık gösterir. Genel olarak, peptitlerin ortalama moleküler ağırlığı <10 kDa iken, proteinler 10 kDa' dan daha büyük molekül ağırlığına sahiptir. Biyoaktif peptitlerin çoğu, gıda proteinlerinin polipeptit zincirlerinde bulunan amino asit dizileri olarak ortaya çıkar. Doğal polipeptit dizisinin bir parçası olduğunda, peptit dizilerinin fizyolojik aktiviteler göstermediği ve aktif olmadığı bilinmektedir. Bununla birlikte enzimatik veya kimyasal hidrolizle üretilen serbest peptitler fizyolojik olarak aktif hale gelebilmekte (biyoaktif) ve tedavi amaçlı besinlerin bileşiminde fonksiyonel bileşenler olarak kullanılabilir (Paliyath & Jackson, 2011).

Gıda proteinleri; fonksiyonel özelliklere sahip olduğu bilinen çeşitli biyoaktif peptitlerin kaynağı kabul edilmiştir. Genel olarak, orijinal proteinin içinde inert olan ancak parçalandığında aktif hale gelen biyoaktif peptitlerin, genellikle 2-20 amino asit içerdiği rapor edilmiştir (Himaya ve diğ., 2012). Biyoaktif peptitler, sağlığı teşvik eden, biyolojik etkinlikleri yüksek, dokulardaki düşük birikimleri, yüksek yapısal çeşitlilikleri, düşük molekül ağırlıkları ve ucuz hammaddelerden üretilir olma yetenekleri nedeniyle tercih edilmektedir (Agyei ve diğ., 2016).

Antioksidan, opioid, hipotansif, antimikrobiyal, antitrombotik ve immünomodülatör peptitler gibi çeşitli fizyolojik etkileri ile süt, peynir, et, balık, bitki ve yan ürünlerden izole edilen biyoaktif peptitlere odaklanan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Korhonen & Pihlanto, 2006; Contreras ve diğ., 2009; Ryan ve diğ., 2011; Udenigwe

& Howard, 2013; Jung ve diğ., 2016; W.-S. Kim ve diğ., 2016; Lin ve diğ., 2016; Lee & Hur, 2017).

Gıda proteinlerinden elde edilen çeşitli peptitlerin kan basıncını düşürme, oksidatif bileşiklerin süpürülmesi/nötrleştirilmesi, kan lipid/kolesterol indirgemesi, kalsiyum/mineral emilimini artırma, mikrobiyal gelişmenin engellenmesi ve tümör oluşumunun önlenmesini içeren çeşitli biyoaktif özellikleri bulunmaktadır (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1** : İnsan sağlığının teşviki ve hastalığın önlenmesi ile ilgili gıda proteini kaynaklı peptitlerin biyoaktif özellikleri.

Bununla birlikte tek bir peptitin bu özelliklerin birden fazlasına sahip olabileceği bildirilerek bu tip peptitler, çok işlevli peptitler olarak adlandırılmışlardır. Literatürde yapılan çalışmalarda bazı peptitlerin aynı anda antihipertansif, antioksidan ve antikanser özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Paliyath & Jackson, 2011).

Bazı gıda proteinlerinden çok fonksiyonlu peptitlerin keşfedildiği ve fizyolojik olarak birden fazla önemli biyoaktif özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Süt proteinleri



üzerine yapılan çalışmalarda, tripsin-katalizli sindirimle  $\alpha$ <sub>S1</sub>-kazeinden (f194-199) türetilmiş bir heksapeptidin (TTMPLW), hem ADE inhibe edici hem de immünomodülatör aktiviteler sergilediğini görülmüştür (Meisel, 2004).  $\beta$ -laktoglobulin kaynaklı  $\beta$ -laktorfinin (YLLF), ADE aktivitesini inhibe ettiği ve ayrıca opioid benzeri aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Pihlanto-Leppälä, 2000; Udenigwe & Aluko, 2012).

Terapötik gıdaların formülasyonu için uygun olan biyoaktif peptitlerin molekül ağırlığı, genellikle 1 kDa' dan azdır, ancak molekül ağırlıkları 3 kDa' a kadar olan peptitler tanımlanmıştır. Düşük molekül ağırlıklı peptitler gastrointestinal sistemden (GIS) geçiş sırasında enzimatik hidrolize direnç gösterebilmelerinden ötürü daha çok tercih edilmektedir. Peptitlerin düşük molekül ağırlığında olmaları çeşitli hedef organlara taşındıkları kan dolaşım sistemi içinde daha kolay emilebilmesini de sağlamaktadır. Buna karşılık, yüksek molekül ağırlıklı peptitlerin, gastrointestinal kanaldan geçişte sindirim enzimleri tarafından parçalanma ihtimali de bulunmaktadır. Ayrıca çoğu durumda, yapısal bozulma, peptiti daha az aktif ve hatta inaktif hale getirebilmektedir. Bununla birlikte, bazı durumlarda, peptitler gastrointestinal sistemden geçiş sırasında daha fazla emilebilir veya aktif forma dönüştürülebilir.

Fonksiyonel gıdalar ve nutrasötik maddelerin bileşiminde yer alacak biyoaktif peptitlerin eldesi amacıyla asit veya alkali reaktiflerle kimyasal hidroliz kullanımının insan sağlığı üzerinde zararlı yan ürünlerin açığa çıkması potansiyelinden dolayı enzimatik sindirim tercih edilir. Enzimatik uygulama ile yüksek verimlilikte ve istenmeyen yan ürünler içermeyen iyi tanımlanmış peptitler üretilmektedir. Aynı zamanda kimyasal hidrolizin, peptitlerin beslenme ve fizyolojik aktiviteler için gerekli form olan L-amino asit formuna tahrip ettiği ifade edilmektedir. Nötrleştirme işlemi ile aşırı yüksek tuz seviyelerine yol açabilirken; kimyasal reaktiflerin kullanımı, gıda ürünlerinde protein parçalama kullanımını engelleyebilen asit veya alkali kalıntısının yüksek olduğu bilinen bir ürün açığa çıkarabilir (Paliyath & Jackson, 2011).

Biyoaktif peptitlerin yararlarına rağmen, *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların sonuçlarındaki belirsizlik nedeniyle gastrointestinal ve dolaşım sistemindeki davranışları, gıda işleme ve depolamada uzun süreli stabilitesi (Hernández-Ledesma ve diğ., 2011) ve olası alerjenik reaksiyonlar (Carrasco-Castilla ve diğ., 2012) ve gıda matrisleri ile etkileşimleri konusunda daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulması endüstriyel

üretimine geçişi sınırlandırmaktadır (Korhonen & Pihlanto, 2006; Samaranayaka & Li-Chan, 2011).

### **2.1.1 Biyoaktif peptit üretimi için gıda kaynakları**

Proteinler, amino grubu (-NH<sub>2</sub>), karboksil grubu (-COOH), hidrojen ve -R grubu içeren amino asitler adı verilen moleküler birimlerden oluşan biyopolimerlerdir. Her birim, kendine özgü yapılar ve duyuşsal, besinsel ve fonksiyonel işlevler gösteren özelliklere sahiptir (Vaclavik & Christian, 2008).

#### **2.1.1.1 Hayvansal kaynaklı proteinler**

Son yıllarda, hayvansal protein kaynaklarının önemli bir fonksiyonel protein hidrolizati kaynağı olmasının yanı sıra, gıda endüstrisi yan ürünleri de biyolojik olarak iyileştirme için bir fırsat olmuştur (Martínez-Medina ve diğ., 2018).

Uzun yıllar boyunca, süt immünolojik koruma sağlayan moleküllerin kaynağı olarak kabul edilmiştir. Sütün ayrıca besinsel faydaları vardır ve en zengin biyoaktif madde kaynaklarından biridir (Clare & Swaisgood, 2000). Son zamanlarda, bu zengin gıdadaki proteinlerden türetilen belirli bir bileşik grubu olarak biyoaktif peptitler dikkat çekmektedir. Süt proteinleri temel olarak kazeinler (% 80' i temsil eder,  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - ve  $\alpha$ -kazein'e bölünmüş) ve peynir altı suyu proteinlerinden (diğ. % 20,  $\alpha$ -laktoalbumin  $\beta$ -laktoglobulin, gliko-makropeptit, proteaz pepton 3, immünoglobulinler ve sığır serum albumini) oluşur (Martínez-Medina ve diğ., 2018). Süt, %3,5 protein içeriği ile en çok çalışılan fonksiyonel peptit kaynağıdır (Clare & Swaisgood, 2000). Enzimatik hidroliz yoluyla, süttten üretilen çok çeşitli biyoaktif peptidin, antihipertansif, antimikrobiyal, opioid, mineral bağlayıcı, antidiyabetik, antioksidan ve immünomodülatör etkileri olduğu bildirilmiştir (Nongonierma & FitzGerald, 2015; Martínez-Medina ve diğ., 2018). Ayrıca, araştırmalar peptit üretiminde pek çok farklı süt türünün (sığır, keçi, yak veya hatta deve) bakteri veya fungal enzimler ile farklı hidroliz işlemlerinde kullanıldığını bildirmektedir (Mao ve diğ., 2011; Moslehishad ve diğ., 2013; Ahmed ve diğ., 2015). Peynir altı suyu hidrolizi ile ADE inhibisyonu, mineral bağlama veya opioid aktiviteleri gibi fonksiyonlara sahip peptitlerin elde edildiği bildirilmiştir (Yadav ve diğ., 2015).

Et, evcil hayvanlardan (sığırlar, keçiler, kümes hayvanları) veya vahşi av hayvanlarından elde edilen yenilebilir et olarak tanımlanır. Et önemli bir besindir ve tüketiciler için hayvansal proteindeki ilk seçeneklerden biridir (Lafarga & Hayes,

2014). Et, su, azotlu bileşikler, lipitler, vitaminler, karbonhidratlar ve mineraller içerir. Miyofibriller, sarkoplazmik ve bağ dokusu olmak üzere üç çeşit protein etin % 19' unu oluşturur. Başlıca myofibriller proteinleri; miyozin ve aktin, sarkoplazmik proteinler; enzimler ve miyoglobulin (ete renk veren) ve bağ dokusundaki başlıca proteinler ise kollajen ve elastindir (Martínez-Medina ve diğ., 2018). Kan, hayvan kesimlerinden türetilen bir başka ilginç ve bol proteinli kalıntıdır; su, proteinler, hücreler, enzimler ve inorganik bileşiklerden oluşur sırasıyla % 30 - % 40 ve % 60' ı temsil eden kan hücreleri ve plazma olmak üzere iki bileşenden oluşur. Kan; albümin, fibrinojen, immünoglobulinler, hemoglobin, protrombin ve transferrin gibi proteinler bakımından zengindir (Bah ve diğ., 2013). Hayvanlardan kesim yoluyla üretilen ürünler (gelenek, kültür ve dine bağlı olarak) deri, kemikler, boynuz, ayaklar, tüyler, bağırsaklar, et ve kandır. Bunlar protein bakımından zengin ürünlerdir ve antioksidan ve ADE inhibitör etkilerinin bildirilmesiyle fonksiyonel peptit üretiminde (Di Bernardini ve diğ., 2011) substrat olarak kullanılabilir (Li ve diğ., 2007; Castellano ve diğ., 2013; Bah ve diğ., 2016).

Deniz organizmaları dünyadaki organizmaların yarısını temsil etmektedir (Kim & Wijesekara, 2010) ve fonksiyonel peptitler; amino asit kompozisyonları nedeniyle çok çeşitli işlevsellikler sergileyen, biyoaktif potansiyele sahip protein kökenli moleküllerin üretiminde hammadde olarak görev yapabilmektedirler (Harnedy & FitzGerald, 2012). İç organlar, deri, balık başları, kemikler, yüzgeçler ve kabuklu kabukları gibi yan ürünleri peptit üretiminde kullanmak mümkündür (Pfeiffer, 2003). Hem omurgalılar hem de omurgasızlar için, en bol bulunan proteinler miyozin, aktin ve kollajendir (Di Bernardini ve diğ., 2011) ve bunlardan biyofonksiyonel peptitlerin üretilmesi mümkündür. Deniz canlıları kaynaklı peptitlerde en belirgin aktivitelerin, antioksidan, mineral bağlayıcı, antihipertansif, antikoagulan ve antimikrobiyal aktiviteler olduğu bildirilmiştir (Kim & Wijesekara, 2010)

### **2.1.1.2 Bitki kaynaklı proteinler**

Peptit üretimi açısından proteazın spesifikliği ve çok çeşitli hammadde arayışı göz önüne alındığında protein kaynakları önemli bir konudur. Bitkisel protein kaynağı olarak soya fasulyesi, pirinç, mısır, bezelye ve diğ. önemli yer tutmaktadır.

Soya fasulyesi, yenilebilir yağlar ve izole soya proteini izolatu gibi insan tüketimine yönelik birçok ürün için kaynak olarak kullanılan % 36 protein içeren bir baklagildir. Soya proteini izolatu,  $\beta$ -konglisinin ve glisinin olmak üzere iki ana globulin proteini

içermektedir (Thrane ve diğ., 2016). Protein içeriği yüksek bir baklagil olan, soya fasulyesinin biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Martínez-Medina ve diğ., 2018). Farklı enzimlerin (fungal proteazlar dahil) kombinasyonu ile soya proteinlerinden elde edilen hidrolizatların, *in vitro* antioksidan, antihipertansif veya immünomodülatör etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Kong ve diğ., 2008; Beermann ve diğ., 2009; Gu & Wu, 2013).

Pirinç, Japonya gibi yüksek tüketim oranına sahip bazı ülkelerde en önemli bitkisel protein kaynağını oluşturmaktadır (Hoogenkamp ve diğ., 2016). Öğütülmüş pirinçten veya hipoalerjenik olduğu düşünülen kabuğu kırılmış çekirdek içleriyle pirinç ununa işlendiğinde bile bu ürünlerdeki proteinin büyük kısmı kalmaktadır (Amagliani ve diğ., 2016). Albümin, globülin, glutelin ve prolamin gibi çeşitli proteinler çözünürlüklerine bağlı olarak pirincin toplam protein içeriğinin farklı kısımlarını oluşturmaktadır (Amagliani ve diğ., 2017). *Monascus purpureus* küfü ile pirinç fermantasyonuyla elde edilen peptitlerin *in vivo* (Martínez-Medina ve diğ., 2018) veya *in vitro* antihipertansif etkisinin olduğu bildirilmiştir (Kuba ve diğ., 2009).

Mısır, dünya genelinde tarımı yapılan bir bitkidir ve dünya nüfusunun yanı sıra hayvan yemi için de temel bir bileşen olarak kabul edilir (Pechanova ve diğ., 2013). Tahıl, alkol, viski, glikoz, yağ, bira, sirke ve un üretimi için uygundur ve protein içeriği endospermde %76, tohumda ise %24 gibi hububatın farklı kısımlarında değişmektedir; toplam proteinin %60' ını temsil eden düşük çözünürlükte bir proteinin çoğunluğu prolamina ( $\alpha$ -zein) dir (Martínez-Medina ve diğ., 2018). Bu protein dizilerindeki biyoaktif peptitlerin varlığının, *in vitro* antioksidan veya antihipertansif aktiviteler gösterdiği bildirilmiştir (Wang ve diğ., 2014; Dadshahi ve diğ., 2016; Jin ve diğ., 2016).

Bezelye, dondurulmuş gıda (tam veya bölünmüş), un, protein konsantresi veya nişasta konsantresi gibi farklı kullanımlar için başlıca Kanada, Rusya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yetiştirilen bir üründür. Yetiştirme faktörlerine bağlı olarak %18 ile %30 protein içeren önemli bir protein kaynağıdır. Bezelye, vicilin ve legumin formunda globülinler başta olmak üzere değişik porsiyonlarda farklı tiplerde protein içeriğine sahiptir (Tulbek ve diğ., 2016). Bezelye proteinlerinin ADE inhibitör etkisi olan fonksiyonel hidrolizatların eldesinde kullanıldıkları bildirilmiştir (Jakubczyk ve diğ., 2013; Martínez-Medina ve diğ., 2018).

Amaranth olumsuz iklim koşullarına ve fakir toprağa uyum sağlayabilen, hızlı büyüyen bir bitkidir. Çoğunluğu globülin olmak üzere %13,2 - %18,4 protein içeriğine

(türlere bağılı olarak) sahip, yüksek oranda besleyici bir tahıl olarak tanımlanmaktadır. Amaranthın protein içeriğı yüksek oranda hidrolizlenebilir ve lizin, metiyonin ve sistein bakımından zengindir (Orona-Tamayo & Paredes-López, 2016). Amaranth proteinlerinin enzimatik hidrolizi sonucunda; antitrombotik, immünomodülatör ve antioksidan etkileri olan peptitler elde edildiğı bildirilmiştir (Sabbione ve diğ., 2015; Moronta ve diğ., 2016; García Fillería & Tironi, 2017).

Küspe olarak da adlandırılan yağ atıkları, yağ çıkarma için tohum preslemeden kaynaklanan yan ürünlerdir. Yenilebilir küspe, tohum çeşidine, çevresel koşullarına ve ekstraksiyon yöntemlerine bağılı olarak %15 ile %50 arasında yüksek bir protein içeriğine sahiptir ve genellikle hayvan yemi veya gübreleri için kullanılmaktadır (Ramachandran ve diğ., 2007). Yapılan çalışmalar ayçiçeğı, kolza tohumu, hurma çekirdeğı veya balkabağından elde edilen küspelerin antioksidan, antihipertansif ve antimikrobiyal etkilere sahip peptit üretimi için önemli bir alternatif kaynak olabileceğini göstermektedir (Megías ve diğ., 2009; He ve diğ., 2013; Popović ve diğ., 2013; Tan ve diğ., 2013; Zarei ve diğ., 2015).

### **2.1.2 Biyoaktif peptit elde edilme yöntemleri**

Biyoaktif peptit üretimi alanında, kimyasal sentez, kimyasal hidroliz gibi fizikokimyasal tekniklerin yanı sıra peptitlerin rekombinant ekspresyonu, mikrobiyal fermantasyon ve/veya enzimatik hidroliz gibi moleküler veya biyoteknolojik stratejiler içeren birçok uygulama bulunmaktadır. Bu yöntemler arasında enzimatik hidroliz, gıda ürünlerinden biyoaktif peptit üretimi için en kullanışlı tekniklerden birisi olarak değerlendirilmektedir (Bhat ve diğ., 2015). Enzimatik hidroliz, yan ürünlerin hammadde olarak tekrar kullanılmasına olanak tanıyarak ürün maliyetinin düşürülmesini sağlamaktadır (Mora ve diğ., 2014). Bununla birlikte, enzimatik hidrolizde etkili olabilecek çok sayıda faktör bulunmakta ve optimum proses koşullarının belirlenmesi için ilgili faktörlerin değerlendirilmesi önemlidir. Bu kapsamda, protein substratı, proteaz tipi, enzim spesifikliğı ve hidrolitik prosesle birlikte substrat konsantrasyonu, pH, sıcaklık, enzim-substrat oranı (E: S) ve hidroliz süresi gibi koşullar değerlendirilmesi gereken parametreler olarak tanımlanmaktadır. Faktörlerin değerlendirilmesi sonucunda belirlenen proses koşullarına bağılı olarak hidroliz derecesi (HD), uzunluk, moleküler ağırlık ve amino asit bileşimi gibi peptit özellikleri ve sonuç olarak biyoaktiviteleri farklılık gösterebilmektedir (Van der Ven ve diğ., 2002; Bah ve diğ., 2013; Li-Chan, 2015).

Biyoaktif peptitleri üretmek için kullanılabilir üç ana strateji veya yaklaşım bulunmaktadır:

**Proteinlerin *in vitro* enzimatik sindirimlerinden izolasyonu:** Bu yaklaşımda, enzimler (genellikle mikrobiyal veya bitki kökenli, örneğin flavourzyme, papain, ficin, thermolysin, proase ve nötraz) tek başlarına veya büyük polipeptitleri (gıda proteinleri) küçük peptitlere parçalamak için iki veya daha fazla enzimin bir kombinasyonu olarak kullanılır. Hidroliz sırasında, peptit bağları açılır ve molekül boyutunda küçülme olurken yük yoğunluğunda artış gözlenir bu da peptit ürünlerinin çözünürlüğünün artmasına katkı sağlar. Bu nedenle, peptitler doğal proteinden daha çözündür ve santrifüjleme ile reaksiyon karışımı berraklaşır; süpernatant çözünür peptitleri içerirken, çökelti sindirilmemiş materyaller içerir. Ayrılan süpernatant dondurularak kurutulur veya ultrafiltrasyon gibi başka işlemler için kullanılır. Bu yöntem, çoğunlukla biyoaktif peptitlerin üretiminde en yaygın kullanılan yöntemdir. Pahalı enstrümantasyon gerektirmediğinden hemen hemen her laboratuarda kolayca uygulanabilir. Alternatif olarak, doğal protein, mikrobiyal enzimlerin, proteinleri santrifüjlemeden sonra süpernatantta geri kazanılabilen çözünür peptitlere hidrolize etmek için etki ettiği mikrobiyal fermantasyonuna tabi tutulabilir. Soya fasulyesinin fermantasyonu aynı zamanda biyoaktif peptitlerin üretimine yol açmasına rağmen, süt, mikrobiyal fermantasyon için en yaygın kullanılan substrattır.

**Öncü proteinlerin gerçek veya simüle edilmiş *in vivo* mide-bağırsak sistemi (gastrointestinal sistem-GIS) sindiriminden izolasyonu:** Aslında proteinlerin *in vivo* GIS sindirimi mümkündür, ancak nadiren biyoaktif peptitlerin üretilmesi için kullanılır, çünkü bir protein diyeti uygulanmış canlı hayvanlardan bağırsak içeriklerinin çıkarılmasını gerektirir. Bununla birlikte, GIS sindirimi simüle eden ve düşük maliyetli mikrobiyal enzimlerin varlığı canlı bir hayvanda *in vivo* üretimi tercih edilmeyen bir yöntem haline getirmektedir. Bununla birlikte, GIS sindiriminde, ilk aşama olarak midede sindirimi simüle etmek için protein pepsin ile 1-2 saat boyunca işlenmektedir. Pepsin enzimi reaksiyon ürünü nötral pH değerine (genellikle pH 6,8–7,5) ayarlanır ve pankreatin veya bir tripsin ve kimotripsin kombinasyonu ile hidrolize edilir. Bu yöntem, bağırsak dokusunun kenar hücrel proteazlarının potansiyel etkilerini taklit etmese de, diyetin bir parçası olarak tüketildiğinde bir gıda proteininden serbest kalacak potansiyel biyoaktif peptitleri tahmin etmek için kullanışlıdır.

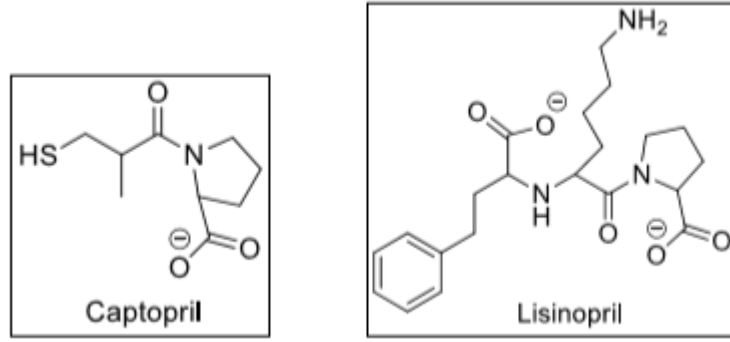
Biyoaktif olduğu bilinenlerle aynı veya benzer yapıya sahip peptitlerin kimyasal sentezi: Çoğu durumda, fraksiyonlama ve saflaştırma yöntemlerinin kullanılması ile peptitler yeterli veya ekonomik olarak istenen miktarlarda üretilememektedir. Bu nedenle, peptit dizileri kimyasal olarak sentezlenmektedir. Bu yaklaşım sadece bilinen biyoaktif peptitlerin amino asit dizisi hakkında bilgi mevcutsa kullanılabilir, ancak peptitlerin protein sindirimi ve peptit saflaştırılmasından daha uygun maliyetli bir yaklaşımdır. Peptitlerin kimyasal sentezi, çoğu laboratuvarında bulunmayan özel enstrümanlar gerektirir. Bu nedenle, peptit sentezi genellikle kimya şirketleri tarafından ücret karşılığında gerçekleştirilir. Bununla birlikte, kimyasal sentez ile ilgili ana problemlerden biri, kimyasal safsızlıkların varlığı ve stereokimyada izole edilmiş doğal peptit ile karşılaştırıldığında etkinliği etkileyebilecek farklılıklar bulunmasıdır (Paliyath & Jackson, 2011).

### **2.1.3 Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitör peptitler**

Hipertansiyon, kardiyovasküler komplikasyonlar ile dünya çapında 9,4 milyon ölüme sebep olmaktadır. Hastalarda kronik kan basıncı yükselmesi görülen ancak kontrol edilebilir bir hastalıktır (Martínez-Medina ve diğ., 2018). Hipertansiyon, kalp ve damar bozuklukları, böbrek hastalığı, arteriyoskleroz ve inme gibi birçok ciddi hastalığa yol açabilir (bulaşıcı olmayan hastalık hakkında küresel durum raporu, WHO, 2014). Memeli kan basıncı, renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzimden (ADE) oluşan renin-anjiyotensin sistemi (RAS) tarafından düzenlenir. Kan basıncının artmasına neden olan ADE kan basıncını arttırmada önemli bir rol oynar (Lee & Hur, 2017). Fizyolojik olarak kan basıncında renin, anjiyotensinojeni anjiyotensin I' e katalize eder. Daha sonra anjiyotensin I anjiyotensin II' ye (güçlü bir vazokonstriktör) *in vitro* olarak dönüştüren anjiyotensin dönüştürücü enzim gibi çeşitli mekanizmalarla kontrol edilir (Hernández-Ledesma ve diğ., 2011). Gıda proteinlerinden biyoaktif peptitler, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibisyonu ve antihipertansif aktivite gibi insan sağlığı üzerinde faydalı etkiler gösterir.

İlk gıda proteini kaynaklı ADE inhibe edici peptit grubu 1979'da *Clostridium histolyricum*'dan elde edilen kollajenaz ile jelatinin hidrolize edildiği Japon bilim adamları tarafından rapor edilmiştir. Bunu, bazı fermente süt ürünlerinin antihipertansif özelliklerinden sorumlu olduğu yaygın olarak bilinen süt tripeptitlerinin VPP ve IPP tanımlanması izlemiştir. O zamandan beri, çeşitli gıda

kaynaklarından saflaştırılmış ADE inhibe edici peptitlerin (300'ün üzerinde) sayısında önemli bir artış olmuştur (Paliyath & Jackson, 2011). ADE inhibitörleri, renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) aktivasyonunu engelleyen yüksek kan basıncı ilaçlarıdır ve piyasada mevcut olan ADE inhibitörleri, benazepril, kaptopril, enalapril, perindopril, trandolapril, kinapril, akeon ve univasc'dır. Şekil 2.2' de ADE inhibitörlerinden kaptopril ve lisinoprilin yapısı görülmektedir (Çifçi, 2014).



**Şekil 2.2 :** ADE inhibitörlerinin yapısı; Kaptopril ve Lisinopril.

Bununla birlikte, yukarıda belirtilen ADE inhibitörlerinin öksürük, kan potasyum seviyesini artırma, düşük kan basıncı, deri döküntüsü, baş ağrısı, yorgunluk, fetal bozukluk ve anormal bir tat gibi yan etkileri vardır (Lee & Hur, 2017). Bu nedenle çalışmalarda bunların yerini alacak yeni antihipertansif moleküller keşfedilmeye odaklanılmıştır (Harnedy & FitzGerald, 2012). Doğal gıdalardan elde edilen 2 ile 12 birim uzunluğa sahip kısa peptitlerden oluşan ADE inhibitörleri sentetik ADE inhibitör ilaçlarına bir alternatif olarak görünmektedir (Hernández-Ledesma ve diğ., 2011; Lee & Hur, 2017).

Gıda peptitlerinin uzun süreli kullanımdan sonra herhangi bir olumsuz yan etki oluşturmadığı ve hipertansiyon tedavisi için ilaçlardan daha güvenli olduğu kabul edilmiştir (Udenigwe & Aluko, 2012).

ADE inhibe edici peptitlerin hayvansal ürünlerden, deniz canlılarından ve pepsin, kimotripsin ve tripsin gibi hidrolize edici enzimler aracılığıyla bitki kaynaklı ve alkalaz, termolizin, flavourzyme ve proteinaz K gibi mikrobiyal enzimlerden elde edildiği çok sayıda çalışmada bildirilmiştir (Saiga ve diğ., 2003; Mao ve diğ., 2007; Udenigwe ve Howard, 2013).

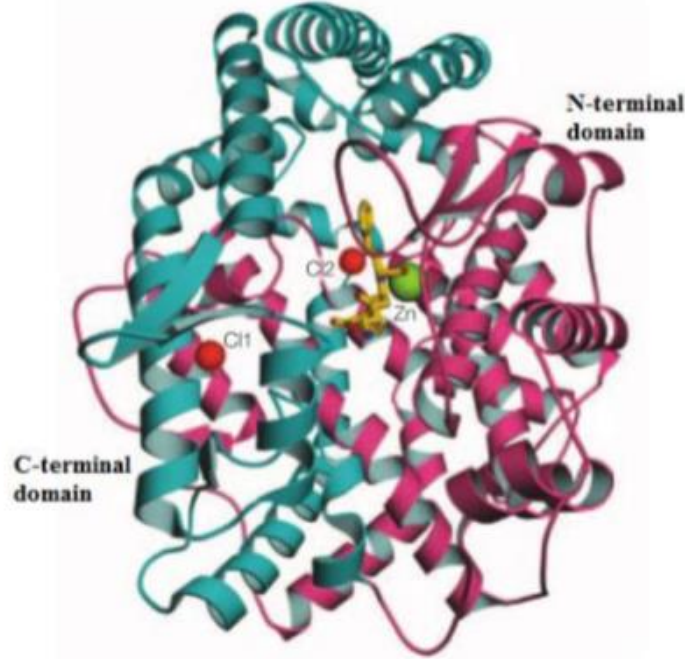


ADE inhibe edici etki, farklı peptit dizileri ve moleküler ağırlıklar ile yakından ilişkilidir. ADE inhibe edici peptitlerin dizileri, N terminalinde hidrofobik (prolin) ve alifatik amino asitlerden (izolösin ve lösin) oluşur (Ruiz ve diğ., 2004).

Düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin vücutta daha yüksek emiliminin bulunması nedeniyle daha fazla ADE inhibisyonuna sahiptir (Daskaya-Dikmen ve diğ., 2017). Literatürde yapılan çalışmalar ADE inhibe edici etkinin, enzimatik hidroliz derecesi ve peptit sekansı ile yakından ilgili olduğunu bildirmektedir (Lee & Hur, 2017).

### 2.1.3.1 ADE inhibitör peptitlerin yapısal özellikleri

ADE Şekil 2.3’de görüldüğü üzere temel olarak bir N-terminal ve bir C-terminal iki ucu içerir. N-terminal bölgesinde yaklaşık 612 amino asit, interdomainde 15 amino asit ve C-terminal bölgesinde yaklaşık 650 amino asit vardır (Çifçi, 2014).



Şekil 2.3 : ADE’ nin kristal yapısı.

Peptitlerin C-terminal ucundaki prolin, tirozin veya triptofan varlığının ADE inhibe edici özelliklere önemli düzeyde katkıda bulunduğu gösterilmiştir. İlk keşfedilen ADE inhibe edici peptitlerden biri olan süt tripeptitlerinin, IPP ve VPP'nin amino asit dizisinde bu durum belirgindir. Aromatik yan zincirlere sahip amino asitlerin varlığının, peptitlerin ADE inhibe edici özelliklerini güçlendirdiği de gösterilmiştir. Örneğin, VLIVP, DLP, LVY, LQP, LKY, VIY, MLPAY, VW, MRW, GQP, IAP, LRW, IKP ve YQY peptitleri, ADE inhibitör aktivitesi yüksek potansiyele sahip

peptitlerdir ve bunların hepsi C-terminalinde hem prolin, tirozin hem de triptofan içerir. Literatürde C-terminalinde hidrofobik amino asit varlığının ADE'nin aktif bölgesine peptitlerin bağlanma yeteneğinde önemli bir belirleyici olduğu bildirilmiştir. Bu peptitler, ADE'nin aktif bölgesi için anjiyotensin I (doğal ADE substratı) ile rekabet eder ve rekabetçi inhibitörler olarak bilinir. Diğer çalışmalar, hacimli veya aromatik yan zincirlere sahip amino asitlerin dipeptitler tarafından (örneğin, VW) tercih edildiğini bildirmiştir. Tripeptitler için, C-terminalindeki aromatik amino asit ile birlikte orta pozisyonda pozitif yüklü bir amino asit ve N-terminalindeki bir hidrofobik amino asit (LKY, MRW, LRW), ADE'ye karşı yüksek etki için en çok tercih edilenlerdir. C-terminalinde tirozin, prolin ve fenilalanin ya da son pozisyondaki fenilalanin varlığının, ADE inhibitörlü tetrapeptitlerin gücüne katkıda bulunduğu düşünülmektedir. C3 pozisyonunda arginin, histidin, triptofan ve fenilalanin veya C4 pozisyonundaki valin, izolösin ve metionin de ADE inhibe edici tetrapeptitlerin etkisi için önemli şartlardır. Tetrapeptitlerden daha uzun olan peptitler için, C-terminalindeki son dört amino asit tipinin ve düzeninin ADE'ye karşı *in vitro* etkisini belirlediği bilinmektedir. Uzun zincirli (> 4 amino asit) peptitlerde, C-terminalindeki tirozin ve sistein veya sondan bir önceki C-terminal ucundaki histidin, triptofan ve metiyonin ADE inhibisyonuna önemli katkıda bulunur. Ayrıca uzun zincirli peptitler için, C3 pozisyonundaki izolösin, lösin, valin ve metiyonin veya C4 pozisyonundaki triptofan, ADE inhibisyonunun arttırılmasına katkıda bulunabileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte, ADE inhibe edici özelliklere en fazla katkıda bulunan peptit zinciri üzerindeki ayrı pozisyonlardaki amino asitlerin en iyi kombinasyonlarını belirlemek için araştırmalara ihtiyaç vardır. Çoğu ADE inhibe edici peptit, di-, tri- ve tetrapeptitler olduğu için, sindirim sisteminden bozulmamış formda emilebilmeleri, hedef organlara ve dokulara ulaşırken aktif formda taşınabilme olasılıkları yüksektir (Paliyath & Jackson, 2011).

Moskowitz (2002), hidrofobik bazlı ADE inhibisyonunun hidrofilik ile karşılaştırıldığında klinik üstünlüğünü açıklayan bir model önermiştir. Tüm ADE inhibitörleri, C-terminal katalitik bölgesine bağlanır, ancak sadece hidrofobik olanlar, N-terminal katalitik bölgesini bağlar ve bloke eder. Bu model, ADE inhibe edici peptitlerin uçlarında hidrofobik amino asitlere sahip olmasının nedenini açıklamaktadır (Lee & Hur, 2017). Hidrofobik amino asitlerin, sistemik tansiyonu düşürmenin yanı sıra, belirli yerel faydaları vardır (Wang ve diğ., 2008). Bu durumda, bir hidrofobik

amino asidin neden olduğu kan basıncı düşüşünün, enzim ve ligand arasındaki hidrofobik etkileşimin kuvvetli bağlanma etkisinin bir sonucu olarak ADE rekabetçi inhibisyonu görülmektedir (Kobayashi ve diğ., 2008). Ek olarak, hidrofobik ve H-bağ etkileşimleri olarak bilinen enzim alanındaki ADE inhibitörleri ile  $Zn^{2+}$  arasındaki etkileşimler, katalizin modüle edilmesinden sorumludur (Ni ve diğ., 2012).

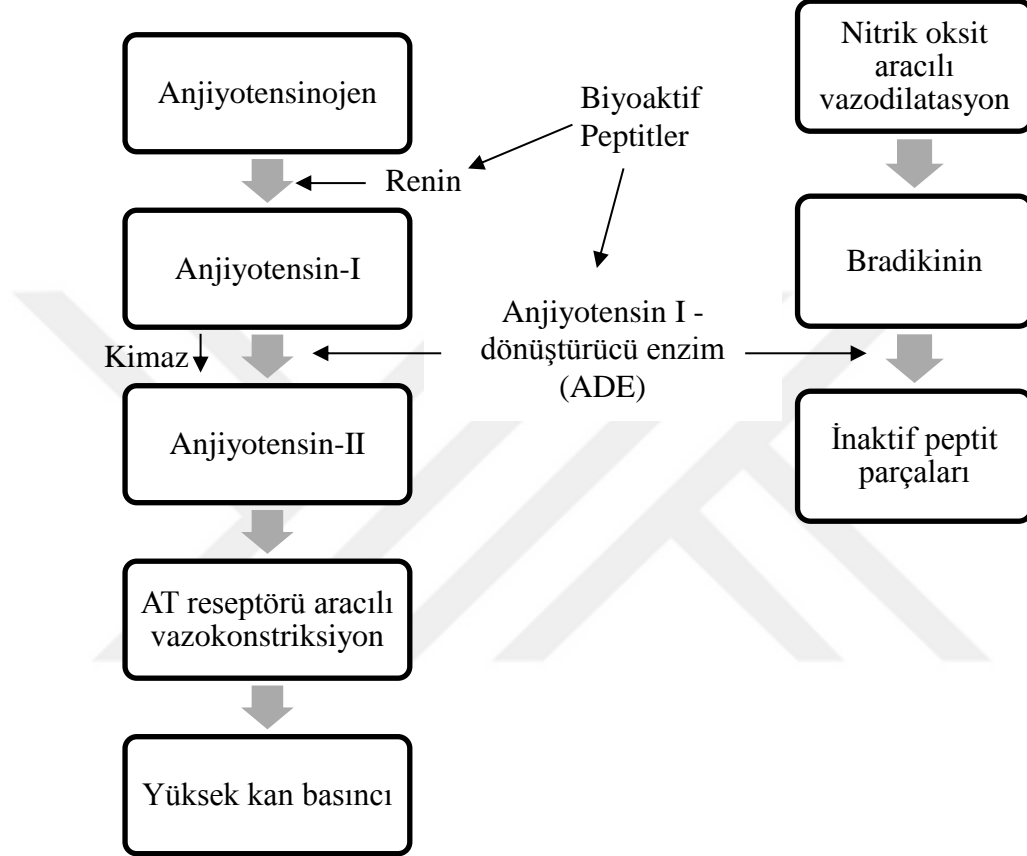
Bu nedenle, doğal malzemelerden türetilen ADE inhibe edici peptitler, hipertansiyonda kullanılabilecek potansiyel maddeler olarak önem kazanmıştır. Spontan hipertansif sıçanlar (SHR'ler) kullanan *in vivo* çalışmalardan elde edilen sonuçlar, gıdalardan elde edilen ADE inhibe edici peptit kullanımıyla hipertansiyonda önemli bir azalma sağlanabileceğini göstermektedir (Saito ve diğ., 1994; Yoshii ve diğ., 2001). Hayvansal ürünlerden (süt, peynir ve et, balık) ve bitkilerden elde edilen ADE inhibe edici peptitler stabildirler ve sentetik ADE inhibitörleri ile karşılaştırıldığında minimal yan etkileri vardır (Lee & Hur, 2017).

ADE, terminal pozisyonlarında hidrofobik amino asit dahil substratlar veya rekabetçi inhibitörler için seçiciliğe sahiptir. Ayrıca, ADE inhibisyon mekanizması, katalitik bölgeden farklı bir anyonik bağlanma bölgesi ile bir etkileşimi içerebilir. Bu nedenle, peptit dizisinin ADE önleyici kapasitesine karşılık gelmesi gerektiği varsayılmaktadır (Turner & Hooper, 2002).

### **2.1.3.2 ADE inhibitör peptitlerin etki mekanizması**

ADE inhibisyonu büyük ölçüde RAS (renin-anjiyotensin sistemi) ve NOS (nitrik oksit sistemi) olmak üzere iki tür kan basıncı sistemi ile ilgilidir. ADE, vücuttaki sıvı miktarını kontrol ederek kan basıncını düzenleyen RAS'ın temel bir bileşenidir. Hipertansiyon mekanizmasına gelince, karaciğerden türetilen prohormon anjiyotensinojenin N-terminali, dekapeptit anjiyotensin I (Ang I) üreten renin enzimi tarafından salınır. Daha sonra ADE, Ang I C-terminal dipeptit His-Leu'yu parçalayarak, kan basıncını artıran anjiyotensin II'ye (Ang II) dönüştürülür. Ang II fizyolojik koşullar altında optimum oranda kan damarlarının normal kasılmalarını koruyan güçlü bir vazokonstriktördür. Ayrıca Ang II,  $AT_1$  ve  $AT_2$  reseptörüne bağlanır, özellikle  $AT_1$  reseptörü, vazokonstriksiyon üretimine neden olur (Lee & Hur, 2017). Bu nedenle, ADE inhibitörleri, Ang II oluşumunu ve bradikinin yıkımını azaltarak bu mekanizma yoluyla antihipertansif etkiler gösterebilir. ADE hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyesinde bir artışa neden olan  $\beta$ -reseptörlerine bağlanan bradikininin etkisiz

hale getirir. Artan  $Ca^{2+}$  seviyesi ve bradikinin, nitrik oksit sentazı L-arjinin'i güçlü bir vazodilatör olan nitrik okside dönüştürmesine neden olur (FitzGerald & Norris, 2013). Bu nedenle, peptitlerin kan basıncının ana düzenlemelerinin RAS ve NOS yolu ile ilişkili olabileceği varsayılmaktadır. RAS ve peptit inhibisyonuna duyarlı olduğu bilinen reaksiyonlar, Şekil 2.4'de gösterilmiştir (Paliyath & Jackson, 2011).



**Şekil 2.4 :** Biyoaktif peptitler için moleküler hedefleri (renin ve anjiyotensin-dönüştürücü enzim) gösteren kan basıncını düzenleyen renin-anjiyotensin sistemi yolu.

Bununla birlikte, bir RAS bozukluğu aşırı ADE seviyelerine ve dolayısıyla kan damarlarının aşırı daralmasına yol açabilir, eğer kontrolsüz bırakılırsa hipertansiyona ve böbrek fonksiyon bozukluğu ve sol venöz hipertrofi gibi kardiyovasküler sorunlara yol açar. Bu nedenle, ADE ve renin inhibitörleri, hipertansif hastalarda nihai vasküler Ang II üretimini azaltmak ve kan basıncını azaltmak veya düzenlemekte yardımcı olmaktadır. Aliskiren, renin inhibitörü olarak onaylanan tek farmakolojik faktör iken, bazı ilaçlar (kaptopril, enalapril, lisinopril, vb.) etkili ADE inhibitörleri olarak mevcuttur. Bununla birlikte, antihipertansif ilaçların kullanımıyla ilişkili kuru öksürük ve ödem gibi olumsuz yan etkilerden dolayı, gıda proteini kaynaklı peptitlerin uygun

alternatifler olarak geliştirilmesine yönelik çabalar artmıştır (Paliyath & Jackson, 2011).

Protein hidrolizatlarının ve saflaştırılmış peptitlerin potansiyeli, ADE aktivitesinin % 50'sini inhibe eden ve IC50 olarak adlandırılan konsantrasyon olarak ifade edilir; değer ne kadar düşük olursa, protein hidrolizatı veya peptiti o kadar güçlü olur. Çoğu ilacın terapötik etkinliği (IC50 değerleri) nanomolar (nM) seviyesinde iken, çoğu gıda proteini kaynaklı ADE inhibe edici peptitler yalnızca mikromolar ( $\mu\text{M}$ ) veya millimolar (mM) konsantrasyonlarında etkilidir. Bununla birlikte vücut, gıda peptitlerini normal proteinler olarak algıladığından ve bunları uygun şekilde işlediğinden, terapötik aktivite için gereken seviyeleri aşan büyük dozlarda tüketildiğinde yan etkiye sebep olma ihtimalleri çok düşüktür. Aksine, aşırı ilaç dozu vücutta toksik yan etkilere neden olabilir. Birçok insanda uygulanan, tedavi edici madde olarak gıda peptitlerinin kullanımı sırasında hiçbir olumsuz yan etki görülmemiştir (Paliyath & Jackson, 2011).

### **2.1.3.3 ADE inhibitör peptit uygulamaları**

Biyoaktif peptitler, “Fonksiyonel Gıdalar” veya “Nutraceuticals” olarak pazarlanan birçok ürün veya bileşenin temel bileşenleridir. Bu ürünlerde, biyoaktif peptitler, normal üretim işleminin değiştirilmesiyle (örneğin, işlem parametrelerinin değiştirilmesi veya başlangıç kültürlerinin kullanılmasıyla) ilave edilir veya zenginleştirilir. Bu kapsamda özellikle Japonya ve bazı Avrupa ülkelerinde ticarileştirilmiş ürünler bulunmaktadır. Çizelge 2.1’ de biyolojik olarak aktif peptidleri içeren ve antihipertansif etkiye sahip olan ticari olarak temin edilebilen fonksiyonel gıdalar ve gıda maddelerinin bazı örnekleri listelenmiştir (FitzGerald ve diğ., 2004; Korhonen & Pihlanto, 2006; Hartmann & Meisel, 2007).

Ticari olarak, biyoaktif peptitler, özelleştirilmiş enzimatik protein hidrolizinden *in vitro* üretilir ve özel fizyolojik ve beslenme ihtiyaçları olan hastalara özel terapötik destek sağlarlar (Paliyath & Jackson, 2011).

Saflaştırılmış peptitlerin yanı sıra, birkaç gıda proteini hidrolizatının, ADE inhibitörleri ve antihipertansif ajanlar olarak *in vitro* ve *in vivo* olarak etkili olduğu gösterilmiştir. ADE inhibitörü peptitleri tüketen kişilerin kan basıncında düşüşlerin görülmesi ADE inhibitörü peptitleri içeren fonksiyonel gıdaların üretimine önem kazandırmıştır (Aluko, 2019).

**Çizelge 2.1:** ADE inhibitör peptit içeren bazı ticari ürünler.

Ürün adı	Ürün Tipi	Peptit içeriği	Üretici	Referans
Calpis AMEEL S (Japonya) ya da Calpico (Avrupa)	Fermente Süt	VPP, IPP	Calpis Co., Japonya	FitzGerald ve diğ., 2004; Korhonen & Pihlanto, 2006
Evolus	Kalsiyumla Zenginleştirilmiş Fermente Süt	VPP, IPP	Valio, Finlandiya	FitzGerald ve diğ., 2004; Korhonen & Pihlanto, 2006
C12	Gıda Katkısı/Hidrolizat	Kazein Kaynaklı Peptit FFVAPFPEVFGK	DMV, Hollanda	FitzGerald ve diğ., 2004; Korhonen & Pihlanto, 2006
Peptide Soup	Çorba	Bonito Kaynaklı peptitler	Nippon, Japonya	FitzGerald ve diğ., 2004; Hartmann & Meisel, 2007
Casein DP Peptio Drink	Meşrubat	Kazein Kaynaklı Dodekapeptid FFVAPFPEVFGK	Kanebo, Japonya	Hartmann & Meisel, 2007
Biozate	Hidrolize edilmiş peynir altı suyu proteinleri izolatı	$\beta$ -laktoglobulin fragmentleri/hidrolizatı	Davisco, Amerika Birleşik Devletleri	FitzGerald ve diğ., 2004; Korhonen & Pihlanto, 2006

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Mikroorganizma kültürleri

Tez çalışması kapsamında Daşkaya Dikmen ve diğ. (2018) tarafından çevresel örneklerden ve Öztekin ve diğ. (2018) tarafından meyve ve fermente ürünlerden izole edilen mayalar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kültürler ve izolasyon kaynakları Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’ de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1 : Maya İzolatları ve İzolasyon Kaynağı.**

İzolat Kodu	Maya Adı	İzolasyon Kaynağı
B010	<i>Yamadazyma</i> spp.	
B013-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	
B015-1	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	Ot Örnekleri
B015-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	
B04	<i>Yamadazyma</i> spp.	
B5-1	<i>Rhodosporeidiobolus colostri</i>	
B514-1	<i>Yamadazyma</i> spp.	Yağmur Suyu
B514-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	
BY2	<i>Rhodosporeidiobolus colostri</i>	
BY9	<i>Rhodosporeidiobolus colostri</i>	Yapraklar

**Çizelge 3.2 : Maya İzolatları ve İzolasyon Kaynağı.**

İzolat Kodu	Maya Adı	İzolasyon Kaynağı
SB-29	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Böğürtlen
SU-35	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Üzüm
SU-34	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Üzüm
SE-42	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Elma
SZY-41	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Zeytin Yağrağı
SK-14	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Kuşburnu
SKI-38	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Kızılcık
SKI-36	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Kızılcık
SU-4	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Üzüm
SK-16	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Kuşburnu
SB-26	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Böğürtlen
SK-21	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Kuşburnu
SK-12	<i>Metschnikowia sp.</i>	Kuşburnu
SU-2	<i>Metschnikowia aff. fruticola S1-44</i>	Üzüm
SK-20	<i>Metschnikowia aff. fruticola CEC F2</i>	Kuşburnu
SBY-7	<i>Pichia guiliermondii</i>	Böğürtlen Yaprağı
SK-18	<i>Pichia kluyveri</i>	Kuşburnu

### 3.1.2 Besiyeri ve çözeltiler

Çalışmada, mayaların geliştirilmesi için Tryptic Soy Broth (TSB, MERCK No: 1.05459) ve mayaları +4°C’de saklamak üzere Tryptic Soy Agar (TSA, MERCK No: 1.05458) besiyerleri kullanılmıştır.

İzolatların McFarland (MCF) konsantrasyonu ayarlamasında kullanılmak üzere fizyolojik tuzlu su çözeltisi (FTS) 1000 mililitre (mL) distile su içerisinde 8,5 gram (g) NaCl (MERCK No: 1.06404) olacak şekilde hazırlanmıştır.

İzolatların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Yadav ve diğ. (2016) tarafından önerilen Çizelge 3.3’de içeriği belirtilen bazal besiyeri kullanılmıştır.



**Çizelge 3.3 : Yağsız süt içeren besiyeri kompozisyonu.**

Besiyeri bileşeni	Miktar
Yağsız süt	150 mL
Maya ekstraktı	1,0 g
Agar-agar	18 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	0,043 g
NaCl	5,0 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,0 g
d.H <sub>2</sub> O	850 mL

Çalışma kapsamında kullanılan tüm besiyerleri otoklavda 121°C’ de 15 dakika sterilize edilerek kullanılmıştır.

ADE inhibisyon aktivitesi analizlerinde kullanılmak üzere; 100 mM borat tampon çözeltisi (pH 8.3, 300 mM NaCl içeren), 5 mM hippuril-L-histidil-L-ösün (HHL, Sigma ALDRICH, USA), 1N HCl; 100 mU anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE, Sigma ALDRICH, USA) ve etilasetat (PROLABO, No: 83621) kullanılmıştır. pHmetre kalibrasyonunda pH 4 ve 7 (ISOLAB, Germany) tampon çözeltileri, borat tampon çözeltisinin pH ayarlamasında ise borik asit (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, MERCK No:1.00165) ve sodyum hidroksit (NaOH, MERCK, Darmstadt, Germany) çözeltileri kullanılmıştır.

## **3.2 Metot**

### **3.2.1 Maya izolatlarının geliştirilmesi**

Stok çözeltilerden maya kültürleri, öncelikle TSB besiyerine alınarak 25°C’ de 48 saat inkübasyona bırakılmış olup sonrasında TSA besiyeri bulunan petrilere öze ile çizme plak yöntemiyle ekilerek geliştirilmiştir. Gelişen mayalar TSA besiyeri kullanılarak hazırlanan yatık agarlara ekim yapılarak 25°C’ de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Saflaştırılan maya kültürleri daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere +4°C’ de yatık agarda ve -20°C’ de gliserol stok çözeltisinde saklanmıştır.

### **3.2.2 İzolatların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi**

Maya izolatlarının proteolitik aktivitelerinin incelenmesi amacıyla izolatlar TSB besiyerine ekim yapılarak 25°C’ de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen maya kültürleri önce 4 McFarland (MCF) konsantrasyonuna ayarlanmış, maya süspansiyonundan 10 µL alınarak Çizelge 3.3’ de belirtilen kompozisyonda

hazırlanmış olan bazal besiyerini içeren petrilere tek nokta olarak inokülasyonu yapılmış ve petrilere 15°C, 25°C, 35°C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürelerinin sonunda koloni etrafında çökelti oluşumuna bağlı olarak oluşan hidroliz zonu çapının ölçülmesi ile izolatların proteolitik aktiviteleri değerlendirilmiştir.

Proteaz aktivitesi (Pz indeks değeri), koloni çapının (KÇ) toplam koloni çapı ve çökeltme bölgesi toplam (KÇ+HZ) oranına göre ölçülmüştür. Galán-Ladero ve diğ. (2010) tarafından kullanılan aktivite aralıklarına göre değerlendirme yapılmıştır. Buna göre Pz indeks <0,40 ise yüksek, 0,41-0,60 aralığında orta, 0,61-0,80 aralığında düşük, 0,81-0,99 aralığında çok düşük, 1 ise aktivite yok şeklinde belirlenmiştir. Pz indeks yaygın olarak kullanılan tekrarlanabilir ve yarı kantitatif bir tekniktir (Koga-Ito ve diğ., 2006). Tüm proteolitik aktivite analizleri üç tekrarlı olarak yürütülmüş ve ölçüm sonuçlarının ortalamaları alınmıştır.

### **3.2.3 Mikrobiyal fermantasyon**

Proteolitik aktivitesi belirlenen mayalardan biyoaktif peptit üretme potansiyellerinin incelenmesi amacıyla seçilen 13 farklı izolat, ilk olarak 50 mL'lik steril santrifüj tüplerinde 20 mL TSB bulunan besiyerine ekim yapılarak 25°C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen maya kültürleri 4°C' de 5478 g hızında 10 dak santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pellet kısmı 10 ml FTS çözeltisi ile yıkanarak tekrar 4°C' de 5478 g hızında 10 dak santrifüjlenmiştir ve yine süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pellet kısmı tekrar 10 ml FTS çözeltisi ile yıkanmış olup 4°C' de 5478 g hızında 10 dak santrifüjlenmiştir. İki kere yıkama işlemi yapılmış olan santrifüj tüplerinde kalan pellet kısmı McFarland okuyucusunda (MF-Units, DEN-1, Biosan, Latvia) FTS ile 4 McFarland konsantrasyonuna ayarlanmıştır. Mikrobiyal fermantasyon aşaması öncesinde 250 mL'lik erlenler otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilize edilmiş ve daha sonrasında içerisine protein kaynağı olarak kullanılmak üzere 40 mL UHT yağsız süt konulmuştur. Hazırlanan bu erlenlere 4 MCF konsantrasyonuna ayarlanmış maya süspansiyonundan 2 mL alınarak inokülasyon yapılmıştır. Her izolat için 24 saat ve 48 saat olacak şekilde iki ayrı inokülasyon yapılmıştır. İnoküle edilen erlenler 25°C' de 150 rpm çalkalama hızında 24 saat ve 48 saat olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürelerinin sonunda, fermente olan sütler santrifüj cihazında (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG 22331,

Hamburg, Germany) 10.000 g' de 20 dak santrifüj edilmiş ve süpernatant kısımları alınmıştır. Ayrılmış olan süpernatant kısımlarından ADE aktivitesi analizlerinde kullanılmak üzere steril viallere alınmıştır. Alınan örnekler analizlerde kullanmak üzere -40°C'de saklanmıştır. Tüm numuneler üç tekrarlı olarak hazırlanmıştır.

### 3.2.4 ADE inhibitör aktivitesinin incelenmesi

Süpernatantların anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitör aktivitesinin belirlenmesinde Chaves-López ve diğ. (2012), Rayaprolu ve diğ. (2015) ve Aissaoui ve diğ. (2017) tarafından önerilen yöntemler modifiye edilerek kullanılmıştır. Metot, ADE inhibitör madde varlığında ADE çalışmasının engellenmesi sonucunda hippuril-L-histidil-lösin (HHL) substratının hippürik aside dönüşümünün önlenmesi prensibine dayanmaktadır. ADE inhibitör madde varlığında oluşan hippürik asit miktarı spektrofotometrik olarak ölçülerek % inhibisyon aktivitesi hesaplanmaktadır.

Mikrobiyal fermantasyonu yapılmış örnekler 100 mM borat tampon çözeltisinde çözülmüştür. 50 µL süpernantant ve 5 mM HHL içeren 200 µL borat tampon çözeltisi karıştırılıp 37°C'de 5 dak ön inkübasyona bırakılmışlardır. Daha sonra 20 µL ADE çözeltisi ilave edilerek enzimatik reaksiyon başlatılmıştır. Karışım, 37°C'de 60 dak inkübe edildikten sonra 250 µL HCL (1 N) ilavesi ile reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon sonrasında hippürik asit ekstraksiyonu amacıyla etil asetat ilave edilmiş ve deney tüpleri santrifüj edilmiştir (4000 g, 10 dak). Santrifüj sonrası üst kısımdan 700 µL alınmış ve 100°C'de 60 dak ısıtma uygulanarak etil asetat evapore edilmiştir. Kalan kısım, saf su ile çözümlenerek mikropłaka okuyucuda (Synergy HT, Biotek Instruments Inc., Vinoski USA) 228 nm dalga boyunda absorbansı okunmuştur. Süpernatantların ADE inhibitör aktivitesi Bhaskar ve diğ. (2019) tarafından kullanılan denklem 3.1'de belirtilmiş olan formülle hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon Aktivitesi (\%)} = \frac{(Ac - As)}{Ac} \times 100 \quad (3.1)$$

Ac= Tampon çözeltisi ile ADE reaksiyonu sonucu absorbans (kontrol)

As= Süpernantant çözeltisi ile ADE reaksiyonu sonucu absorbans (örnek)

Tüm analizler üç tekrar ve iki paralel olarak yürütülmüş ve elde edilen değerlerin ortalamaları alınmıştır.

### **3.3 İstatistiksel Analiz**

Sonuç ortalamaları arasındaki istatistiksel önemli farklılıklar ANOVA ve Duncan testi ile %95 güven düzeyinde belirlenmiştir. Tüm istatistiksel analizler için Minitab İstatistik Yazılımı (Versiyon 19; Minitab Inc., State College, PA, USA) ve SPSS 16.00 programı kullanılmıştır.

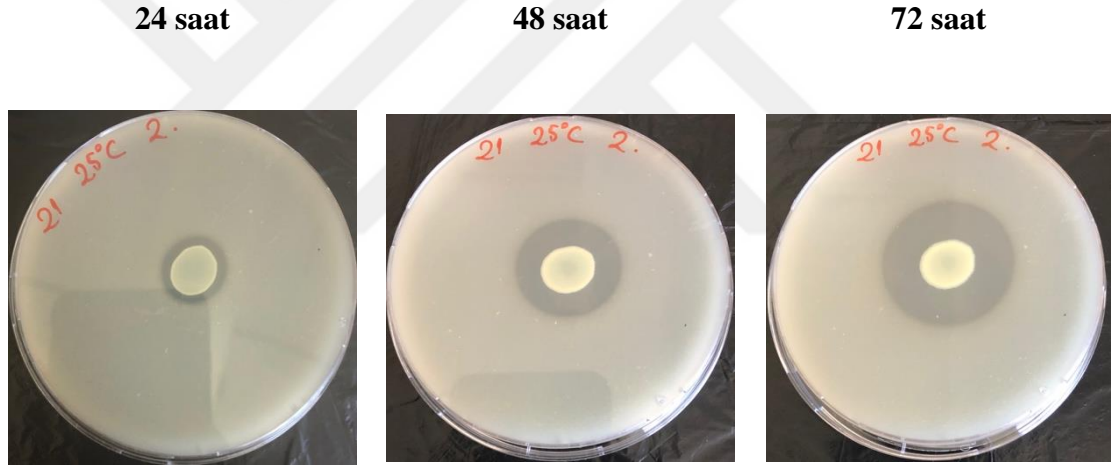


## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 İzolatların Proteolitik Aktiviteleri

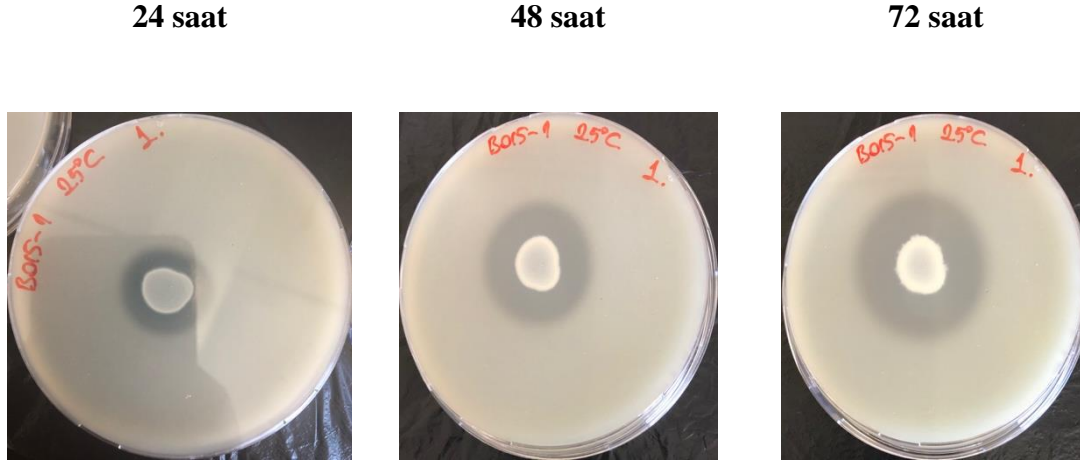
Çevresel örneklerden ve gıda ürünlerinden izole edilen mayaların proteolitik aktiviteleri katı besiyerinde 15, 25 ve 35°C’ de üç gün süreyle incelenmiştir.

Şekil 4.1, 4.2, 4.3’de inkübasyon süresinin izolatların proteolitik aktiviteleri üzerinde etkili bir faktör olduğu görülmektedir. İncelenen izolatlar daha çok 25°C ve 35°C sıcaklıklarında aktivite göstermekte ve genellikle inkübasyon süreleri arttıkça hidroliz zonlarının arttığı görülmektedir.

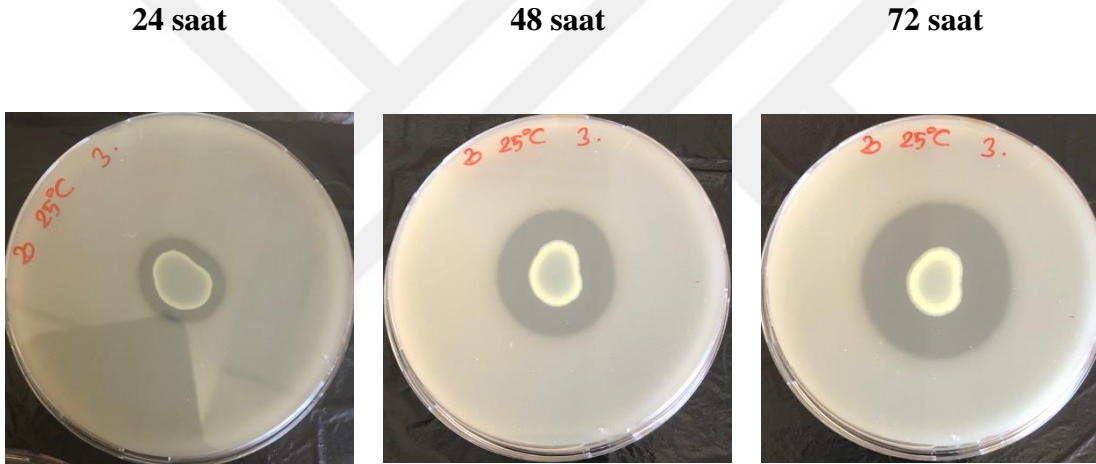


**Şekil 4.1 :** *Metschnikowia* spp. SK-21 izolatının 25°C’ deki 24, 48 ve 72 saatteki koloni çapı ve koloni çapı ile hidroliz zon toplam çapının görselleri.

Sonuçlar incelendiğinde mayaların 25°C sıcaklığında 24 saat inkübasyon sonucundaki Pz indeks aktiviteleri 0,60 – 1 aralığında değişmekteyken; 48 saat inkübasyon sonucunda 0,33 – 1 aralığında; 72 saat inkübasyon sonucunda ise 0,20 – 1 arasında proteolitik aktiviteleri değişmektedir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında genellikle 25°C sıcaklığında en yüksek proteolitik aktivitelere ulaşıldığından dolayı ADE analizlerinde 25°C sıcaklığında 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinde çalışmalar yürütülmüştür.



**Şekil 4.2 :** *Cystofilobasidium* spp. B015-1 izolatının 25°C’ deki 24, 48 ve 72 saatteki koloni çapı ve koloni çapı ile hidroliz zon toplam çapının görselleri.



**Şekil 4.3 :** *Metschnikowia* spp. SK-20 izolatının 25°C’ deki 24, 48 ve 72 saatteki koloni çapı ve koloni çapı ile hidroliz zon toplam çapının görselleri.

Günümüzde en çok kullanılan mikrobiyal proteaz kaynakları bakteri, fungus ve virüslerdir. Mikrobiyal kaynaklı proteazlar üretim kolaylığı ve düşük maliyetli üretimi, süreklilik, in vitro koşullarda aktif olması, alerjen ve toksik etkiye sahip olmaması gibi avantajlar nedeniyle bitkisel ve diğer proteaz kaynaklarına göre daha fazla ilgi görmektedirler (Tolan, 2015).

Hücre dışı (ekstraselüler) proteaz üretimi ortamdaki karbon ve azot kaynakları, mineral maddelerin varlığı gibi besin öğelerinden etkilenmektedir (Chi ve diğ., 2007). Ayrıca inkübasyon süresi, karıştırma hızı, ortamdaki oksijen miktarı ve ortamın pH değeri de üretilen proteazın aktivitesini etkilemektedir (Wang ve diğ., 2008). Bu

sebeple, proteaz üreticisi mikroorganizmanın proteaz aktivitesini arttırmak için optimum koşullar belirlenmektedir. Etkili faktörler mikroorganizma suşuna bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Kim ve diğ., 2016). Wang ve diğ. (2008) tarafından yapılan çalışmada proteaz fermentasyonunda en etkili faktörün sıcaklık olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda mikroorganizmanın (*Colwellia* bakterisi) proteaz üretimi için ortamda bir protein kaynağının olması gerektiğini bildirmişlerdir. Chi ve diğ. (2007)'nin yaptıkları çalışmada *Aureobasidium pullulans* için en etkili azot kaynağının NaNO<sub>3</sub> ve KNO<sub>3</sub> karbon kaynağı olarak da nişastanın en etkili olduğu belirlenmiştir. Han ve diğ., (2016), *Pseudoalteromonas arctica* bakterisinin maksimum proteaz üretimi için uygun karbon kaynağının yağsız süt tozu varlığında fruktoz olduğunu bildirmiştir.

Çizelge 4.1, 4.2, 4.3' de sırasıyla 15, 25 ve 35°C' de 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde ölçülen proteolitik aktivite değerlerinin Pz indeks sonuçları verilmiştir. Pz indeks değeri ne kadar küçükse proteolitik aktivitenin o kadar yüksek olduğu bildirilmektedir (Galán-Ladero ve diğ., 2010).

15°C sıcaklığında ve 72 saat inkübasyon sonucunda en yüksek proteolitik aktiviteye sahip izolatın 0,37 Pz indeks değerindeki *Yamadazyma* spp. B015-2 izolatı olduğu görülmektedir. Çizelge 4.1'de yer alan proteolitik aktivite değerleri bulunan SU-35, SE-42, SK-14, SK-21, SK-12, SK-20, B013-2 kodlu izolatların 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonucundaki aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunduğu görülmektedir. B015-1, BY9, B514-1 izolatlarının 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonucundaki aktivitelerinde istatistiksel önemli fark bulunmuştur. SKI-38 kodlu izolatın ise 72 saat inkübasyon sonucunda istatistiksel olarak önemli fark bulunmaktadır. 15°C inkübasyon sıcaklığında 27 maya izolatının inkübasyon süresi arttıkça genellikle proteolitik aktivitesinin arttığı görülmektedir. Bu durum izolatların zamanla C ve N kaynaklarını kullanabildiklerini göstermektedir. Düşük aktiviteye sahip izolatlarda ise proteaz dışındaki metabolitlerin üretimi için C ve N kaynaklarının kullanılmış olabileceği düşünülmektedir.

**Çizelge 4.1 : Maya izolatlarının 15° C’ deki proteolitik aktiviteleri.**

İzolat Kodu	Mikroorganizma	24 saat			48 saat			72 saat		
		KÇ	KÇ+HZ	Pz İndeks	KÇ	KÇ+HZ	Pz İndeks	KÇ	KÇ+HZ	Pz İndeks
B015-1	<i>Cystofilobasidium</i> spp.	-	-	- <sup>1</sup>	19,5	26	0,75 <sup>a</sup>	20,2	34,5	0,58 <sup>b</sup>
SB-29	<i>Hanseniaspora</i> spp.	4,7	4,7	1,00 <sup>a</sup>	8,3	8,3	1,00 <sup>a</sup>	10,5	10,5	1,00 <sup>a</sup>
SU-35	<i>Hanseniaspora</i> spp.	15,2	17,2	0,88 <sup>a</sup>	17,2	22	0,78 <sup>b</sup>	17,5	27	0,65 <sup>c</sup>
SU-34	<i>Hanseniaspora</i> spp.	-	-	-	9,7	9,7	1,00 <sup>a</sup>	12,7	12,7	1,00 <sup>a</sup>
SE-42	<i>Hanseniaspora</i> spp.	14,8	15	0,99 <sup>a</sup>	15,8	24	0,66 <sup>b</sup>	16,5	30,5	0,54 <sup>c</sup>
SZY-41	<i>Hanseniaspora</i> spp.	7,5	7,5	1,00 <sup>a</sup>	11,2	11,2	1,00 <sup>a</sup>	15,2	15,2	1,00 <sup>a</sup>
SK-14	<i>Hanseniaspora</i> spp.	13,3	13,3	1,00 <sup>a</sup>	17,2	25,7	0,67 <sup>b</sup>	18,2	32,2	0,56 <sup>c</sup>
SKI-38	<i>Hanseniaspora</i> spp.	12,2	12,2	1,00 <sup>a</sup>	18,5	18,5	1,00 <sup>a</sup>	22,5	28,3	0,79 <sup>b</sup>
SKI-36	<i>Metschnikowia</i> spp.	12,5	12,5	1,00 <sup>a</sup>	14,2	14,2	1,00 <sup>a</sup>	17,3	17,3	1,00 <sup>a</sup>
SU-4	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	-	-	-	-	-	13,2	16,3	0,81
SK-16	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	-	-	9,8	9,8	1,00 <sup>a</sup>	11,3	11,3	1,00 <sup>a</sup>
SB-26	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK-21	<i>Metschnikowia</i> spp.	16,2	16,2	1,00 <sup>a</sup>	17,8	21,7	0,82 <sup>b</sup>	18,7	29,2	0,64 <sup>c</sup>
SK-12	<i>Metschnikowia</i> spp.	19,8	19,8	1,00 <sup>a</sup>	20,3	23,7	0,86 <sup>b</sup>	20,8	30,3	0,69 <sup>c</sup>
SU-2	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	-	-	10,2	10,2	1,00 <sup>a</sup>	11,3	11,3	1,00 <sup>a</sup>
SK-20	<i>Metschnikowia</i> spp.	26,7	26,7	1,00 <sup>a</sup>	28,8	34,7	0,83 <sup>b</sup>	29,3	42,7	0,69 <sup>c</sup>
SBY-7	<i>Pichia</i> spp.	6,8	6,8	1,00 <sup>a</sup>	13,8	13,8	1,00 <sup>a</sup>	19	19	1,00 <sup>a</sup>
SK-18	<i>Pichia</i> spp.	13,5	13,5	1,00 <sup>a</sup>	14,8	14,8	1,00 <sup>a</sup>	15	15	1,00 <sup>a</sup>
BY2	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	-	-	-	20,8	27,8	0,75 <sup>a</sup>	22	34,7	0,63 <sup>a</sup>
BY9	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	-	-	-	18	26,2	0,69 <sup>a</sup>	20,8	34,7	0,60 <sup>b</sup>
B5-1	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	-	-	-	22,7	28,2	0,80 <sup>a</sup>	23,7	33,3	0,71 <sup>a</sup>
B010	<i>Yamadazyma</i> spp.	7	7	1,00 <sup>a</sup>	13,5	13,5	1,00 <sup>a</sup>	36,2	36,2	1,00 <sup>a</sup>
B013-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	18	18	1,00 <sup>a</sup>	26,3	34,2	0,77 <sup>b</sup>	25,7	38,3	0,67 <sup>c</sup>
B015-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	-	-	-	-	-	-	5,3	14,3	0,37
B04	<i>Yamadazyma</i> spp.	-	-	-	16	20,2	0,79 <sup>a</sup>	19,3	26,5	0,73 <sup>a</sup>
B514-1	<i>Yamadazyma</i> spp.	14	14	1,00 <sup>a</sup>	17,7	19,7	0,90 <sup>a</sup>	18	26,2	0,69 <sup>b</sup>
B514-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	13,3	13,3	1,00 <sup>a</sup>	22,7	22,7	1,00 <sup>a</sup>	26,3	26,3	1,00 <sup>a</sup>

**KÇ:** Koloni Çapı ; **KÇ+HZ:** Koloni Çapı+Hidroliz Zonu ; **Pz İndeks:** Koloni Çapı/(Koloni Çapı+Hidroliz Zonu) ; - : Gelişme yok. <sup>1</sup> : Gelişme görülmeyen suşlar istatistiksel analize dahil edilmemiştir. <sup>a,b,c</sup> : Her inkübasyon süresi için aynı satırda yer alan değerlerde aynı harf içerenler istatistiksel olarak farklı değildir ( $p > 0,05$ ).



25°C sıcaklığında ve 48 saat inkübasyon sonucunda en yüksek proteolitik aktiviteye sahip izolatların 0,33 Pz indeks değerindeki *Yamadazyma* spp. B514-2 ve 0,37 Pz indeks değerindeki *Hanseniaspora* spp. SE-42 izolatı olduğu görülmektedir. 25°C sıcaklığında ve 72 saat inkübasyon sonucunda en yüksek proteolitik aktiviteye sahip izolatların 0,20 Pz indeks değerindeki *Yamadazyma* spp. B514-2 ve 0,34 Pz indeks değerindeki *Hanseniaspora* spp. SE-42 izolatı olduğu görülmektedir. Çizelge 4.2’de yer alan proteolitik aktivite değerleri bulunan SU-35, SE-42, SK-21, BY2, B5-1, B010 kodlu izolatların 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonucundaki aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunduğu görülmektedir. SK-14, SK-20, B013-2, B04, B514-1 kodlu izolatların ise 24 saat inkübasyon süresi aktivite değerlerinde istatistiksel olarak önemli fark bulunmaktadır. SBY-7 izolatının 72 saat inkübasyon süresi sonucundaki aktivitesi istatistiksel olarak önemli farka sahiptir. 25°C inkübasyon sıcaklığında 27 maya izolatının inkübasyon süresi arttıkça genellikle proteolitik aktivitesinin arttığı görülmektedir.

Literatürde çalışmalarda besiyeri bileşiminde bulunan mineral maddelerin enzim üretimini etkileyebileceği bildirilmektedir (Sharma ve diğ., 2017). Joshi & Satyanarayana (2013) tarafından yapılan çalışmada, fermantasyon ortamında bakır elementi varlığının proteaz üretimini teşvik ettiği bildirilmiştir. Mikrobiyal proteaz üretimine substrat etkisinin değerlendirildiği çalışmalarda ortamda bulunan  $MgCl_2$  ve  $CaCl_2$ ’ün proteaz üretimini teşvik ettiği bildirilmiştir (Mothe & Sultanpuram, 2016). Soğukta aktif proteaz üretimi için yapılan bir çalışmada  $NaCl$ ,  $Na_2SO_4$ ,  $Fe(C_6H_5O_7)$  ve  $KCl$  varlığının proteaz üretimini arttırdığı belirlenmiştir (Han ve diğ., 2016). Bu sebeple farklı izolatların mineral maddeleri kullanma farklılıklarından dolayı proteolitik aktivitelerinde farklılıklar görülmüş olabileceği düşünülmektedir.

35°C sıcaklığında ve 48 saat inkübasyon sonucunda en yüksek proteolitik aktiviteye sahip izolatın 0,30 Pz indeks değerindeki *Yamadazyma* spp. B514-2 ve 0,37 Pz indeks değerindeki *Yamadazyma* spp. B04 izolatı olduğu görülmektedir. 35°C sıcaklığında ve 72 saat inkübasyon sonucunda en yüksek proteolitik aktiviteye sahip izolatın 0,30 Pz indeks değerindeki *Yamadazyma* spp. B514-2 ve 0,33 Pz indeks değerindeki *Yamadazyma* spp. B04 izolatı olduğu görülmektedir.

**Çizelge 4.2 : Maya izolatlarının 25° C’ deki proteolitik aktiviteleri.**

İzolat Kodu	Mikroorganizma	24 saat			48 saat			72 saat		
		KÇ	KÇ+HZ	Pz İndeks	KÇ	KÇ+HZ	Pz İndeks	KÇ	KÇ+HZ	Pz İndeks
B015-1	<i>Cystofilobasidium</i> spp.	16,3	27	0,60 <sup>a</sup>	18,2	35,2	0,52 <sup>a</sup>	19,7	42,3	0,46 <sup>a</sup>
SB-29	<i>Hanseniaspora</i> spp.	12	12	1,00 <sup>a</sup>	17	17	1,00 <sup>a</sup>	17,7	17,7	1,00 <sup>a</sup>
SU-35	<i>Hanseniaspora</i> spp.	23,3	27,5	0,85 <sup>a</sup>	23,7	31,7	0,75 <sup>ab</sup>	24	36,7	0,65 <sup>b</sup>
SU-34	<i>Hanseniaspora</i> spp.	11,7	11,7	1,00 <sup>a</sup>	11,75	12,5	0,94 <sup>a</sup>	12	14	0,86 <sup>a</sup>
SE-42	<i>Hanseniaspora</i> spp.	23,3	30,7	0,76 <sup>a</sup>	24,2	65	0,37 <sup>ab</sup>	24,8	72,8	0,34 <sup>b</sup>
SZY-41	<i>Hanseniaspora</i> spp.	11,8	11,8	1,00 <sup>a</sup>	22,7	22,7	1,00 <sup>a</sup>	22,5	22,5	1,00 <sup>a</sup>
SK-14	<i>Hanseniaspora</i> spp.	19,2	29,7	0,65 <sup>a</sup>	20,2	37	0,55 <sup>b</sup>	22,3	43,8	0,51 <sup>b</sup>
SKI-38	<i>Hanseniaspora</i> spp.	15,2	16,2	0,94 <sup>a</sup>	18,2	24,7	0,73 <sup>a</sup>	19,3	30,5	0,63 <sup>a</sup>
SKI-36	<i>Metschnikowia</i> spp.	11	11	1,00 <sup>a</sup>	11	11	1,00 <sup>a</sup>	11,8	11,8	1,00 <sup>a</sup>
SU-4	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	-	- <sup>1</sup>	3	5	0,60 <sup>a</sup>	5	5	1,00 <sup>a</sup>
SK-16	<i>Metschnikowia</i> spp.	16	16	1,00 <sup>a</sup>	10,7	10,7	1,00 <sup>a</sup>	14,7	14,7	1,00 <sup>a</sup>
SB-26	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	-	-	10,8	10,8	1,00 <sup>a</sup>	13,2	13,2	1,00 <sup>a</sup>
SK-21	<i>Metschnikowia</i> spp.	12,8	18,7	0,69 <sup>a</sup>	14,2	27,3	0,52 <sup>b</sup>	15,2	35,2	0,43 <sup>c</sup>
SK-12	<i>Metschnikowia</i> spp.	19	24,7	0,77 <sup>a</sup>	14,5	30,8	0,47 <sup>a</sup>	20,5	39,7	0,52 <sup>a</sup>
SU-2	<i>Metschnikowia</i> spp.	2,3	2,3	1,00 <sup>a</sup>	11	11	1,00 <sup>a</sup>	12,3	12,3	1,00 <sup>a</sup>
SK-20	<i>Metschnikowia</i> spp.	24,8	28,5	0,87 <sup>a</sup>	23,8	38,7	0,62 <sup>b</sup>	24,8	47	0,53 <sup>b</sup>
SBY-7	<i>Pichia</i> spp.	12,3	12,3	1,00 <sup>a</sup>	13,5	15,7	0,86 <sup>a</sup>	14,2	21,5	0,66 <sup>b</sup>
SK-18	<i>Pichia</i> spp.	14,3	14,3	1,00 <sup>a</sup>	30,2	30,2	1,00 <sup>a</sup>	33	33	1,00 <sup>a</sup>
BY2	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	13,7	18,3	0,75 <sup>a</sup>	13	29,3	0,44 <sup>b</sup>	17,7	34	0,52 <sup>ab</sup>
BY9	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	31,2	39	0,80 <sup>a</sup>	32,8	48,8	0,67 <sup>a</sup>	34,3	56,5	0,61 <sup>a</sup>
B5-1	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	16	23,5	0,68 <sup>a</sup>	19,2	32,7	0,59 <sup>ab</sup>	20,7	39	0,53 <sup>b</sup>
B010	<i>Yamadazyma</i> spp.	21	27	0,78 <sup>a</sup>	22,5	36,7	0,61 <sup>ab</sup>	24,5	44,5	0,55 <sup>b</sup>
B013-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	16,8	26,8	0,63 <sup>a</sup>	17,7	36	0,49 <sup>b</sup>	19,3	42,8	0,45 <sup>b</sup>
B015-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	20	20	1,00 <sup>a</sup>	22,5	24,75	0,91 <sup>a</sup>	17,7	23,7	0,75 <sup>a</sup>
B04	<i>Yamadazyma</i> spp.	25,7	32	0,80 <sup>a</sup>	26	41,3	0,63 <sup>b</sup>	26	46,2	0,56 <sup>b</sup>
B514-1	<i>Yamadazyma</i> spp.	27	28,3	0,95 <sup>a</sup>	28,3	36,8	0,77 <sup>b</sup>	30,5	43,7	0,70 <sup>b</sup>
B514-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	-	-	-	4	12	0,33 <sup>a</sup>	4	20,5	0,20 <sup>a</sup>

**KÇ:** Koloni Çapı ; **KÇ+HZ:** Koloni Çapı+Hidroliz Zonu ; **Pz İndeks:** Koloni Çapı/(Koloni Çapı+Hidroliz Zonu) ; - : Gelişme yok. <sup>1</sup> : Gelişme görülmeyen suşlar istatistiksel analize dahil edilmemiştir. <sup>a,b,c</sup> : Her inkübasyon süresi için aynı satırda yer alan değerlerde aynı harf içerenler istatistiksel olarak farklı değildir ( $p > 0,05$ ).

**Çizelge 4.3 : Maya izolatlarının 35° C’ deki proteolitik aktiviteleri.**

İzolat Kodu	Mikroorganizma	24 saat			48 saat			72 saat		
		KÇ	KÇ+HZ	Pz İndeks	KÇ	KÇ+HZ	Pz İndeks	KÇ	KÇ+HZ	Pz İndeks
B015-1	<i>Cystofilobasidium</i> spp.	10,5	19,5	0,54 <sup>b</sup>	18,8	26,5	0,71 <sup>a</sup>	20,8	28,8	0,72 <sup>a</sup>
SB-29	<i>Hanseniaspora</i> spp.	11,3	11,3	1,00 <sup>a</sup>	11,7	11,7	1,00 <sup>a</sup>	13,3	13,3	1,00 <sup>a</sup>
SU-35	<i>Hanseniaspora</i> spp.	29,7	36,2	0,82 <sup>a</sup>	31,2	41,2	0,76 <sup>a</sup>	32,7	43,8	0,75 <sup>a</sup>
SU-34	<i>Hanseniaspora</i> spp.	11,7	12,7	0,92 <sup>a</sup>	12,3	17	0,73 <sup>b</sup>	15	20	0,75 <sup>b</sup>
SE-42	<i>Hanseniaspora</i> spp.	22,8	36,7	0,62 <sup>a</sup>	26,2	48	0,55 <sup>b</sup>	31,2	58,5	0,53 <sup>b</sup>
SZY-41	<i>Hanseniaspora</i> spp.	9,2	9,2	1,00 <sup>a</sup>	11,7	11,7	1,00 <sup>a</sup>	13,2	13,2	1,00 <sup>a</sup>
SK-14	<i>Hanseniaspora</i> spp.	34,3	50,3	0,68 <sup>a</sup>	31,2	43,8	0,71 <sup>a</sup>	38,5	52,3	0,74 <sup>a</sup>
SKI-38	<i>Hanseniaspora</i> spp.	19,8	19,8	1,00 <sup>a</sup>	19,5	19,5	1,00 <sup>a</sup>	21,3	21,3	1,00 <sup>a</sup>
SKI-36	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	-	- <sup>1</sup>	10,7	10,7	1,00 <sup>a</sup>	17	17	1,00 <sup>a</sup>
SU-4	<i>Metschnikowia</i> spp.	27,2	27,8	0,98 <sup>a</sup>	20,8	22,2	0,94 <sup>a</sup>	26,8	28,3	0,95 <sup>a</sup>
SK-16	<i>Metschnikowia</i> spp.	9	9	1,00 <sup>a</sup>	13,3	13,3	1,00 <sup>a</sup>	12,8	12,8	1,00 <sup>a</sup>
SB-26	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	-	-	-	-	-	8	8	1,00
SK-21	<i>Metschnikowia</i> spp.	25,8	29,8	0,87 <sup>a</sup>	31	41,5	0,75 <sup>ab</sup>	31,8	48,8	0,65 <sup>b</sup>
SK-12	<i>Metschnikowia</i> spp.	17,5	24,5	0,71 <sup>a</sup>	18,8	34,8	0,54 <sup>ab</sup>	20,2	42,3	0,48 <sup>b</sup>
SU-2	<i>Metschnikowia</i> spp.	8,2	8,2	1,00 <sup>a</sup>	10,7	10,7	1,00 <sup>a</sup>	11	11	1,00 <sup>a</sup>
SK-20	<i>Metschnikowia</i> spp.	31,5	38,3	0,82 <sup>a</sup>	32	52	0,62 <sup>a</sup>	35	55,7	0,63 <sup>a</sup>
SBY-7	<i>Pichia</i> spp.	12,8	12,8	1,00 <sup>a</sup>	10,3	14	0,74 <sup>b</sup>	14,2	21,2	0,67 <sup>b</sup>
SK-18	<i>Pichia</i> spp.	34	34	1,00 <sup>a</sup>	34,7	34,7	1,00 <sup>a</sup>	33	33	1,00 <sup>a</sup>
BY2	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	32	39,7	0,81 <sup>a</sup>	35,5	45,7	0,78 <sup>a</sup>	37,8	47	0,80 <sup>a</sup>
BY9	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	13,5	24,3	0,55 <sup>a</sup>	16,7	30,7	0,54 <sup>a</sup>	19,8	35	0,57 <sup>a</sup>
B5-1	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	12,8	24,2	0,53 <sup>a</sup>	19,3	33	0,59 <sup>a</sup>	20,8	37,2	0,56 <sup>a</sup>
B010	<i>Yamadazyma</i> spp.	11,5	22	0,52 <sup>a</sup>	16	29,5	0,54 <sup>a</sup>	17,8	31,5	0,57 <sup>a</sup>
B013-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	13,2	26,2	0,50 <sup>a</sup>	14,8	34,3	0,43 <sup>b</sup>	19	37,3	0,51 <sup>a</sup>
B015-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	17,7	21,8	0,81 <sup>a</sup>	21,2	28,8	0,73 <sup>a</sup>	23,3	32	0,73 <sup>a</sup>
B04	<i>Yamadazyma</i> spp.	12	24,8	0,48 <sup>a</sup>	12,5	33,8	0,37 <sup>b</sup>	13,3	40	0,33 <sup>b</sup>
B514-1	<i>Yamadazyma</i> spp.	12	19,3	0,62 <sup>a</sup>	19,3	32	0,60 <sup>a</sup>	23,7	38,5	0,61 <sup>a</sup>
B514-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	3	7	0,43 <sup>a</sup>	3	10	0,30 <sup>a</sup>	4	13,5	0,30 <sup>a</sup>

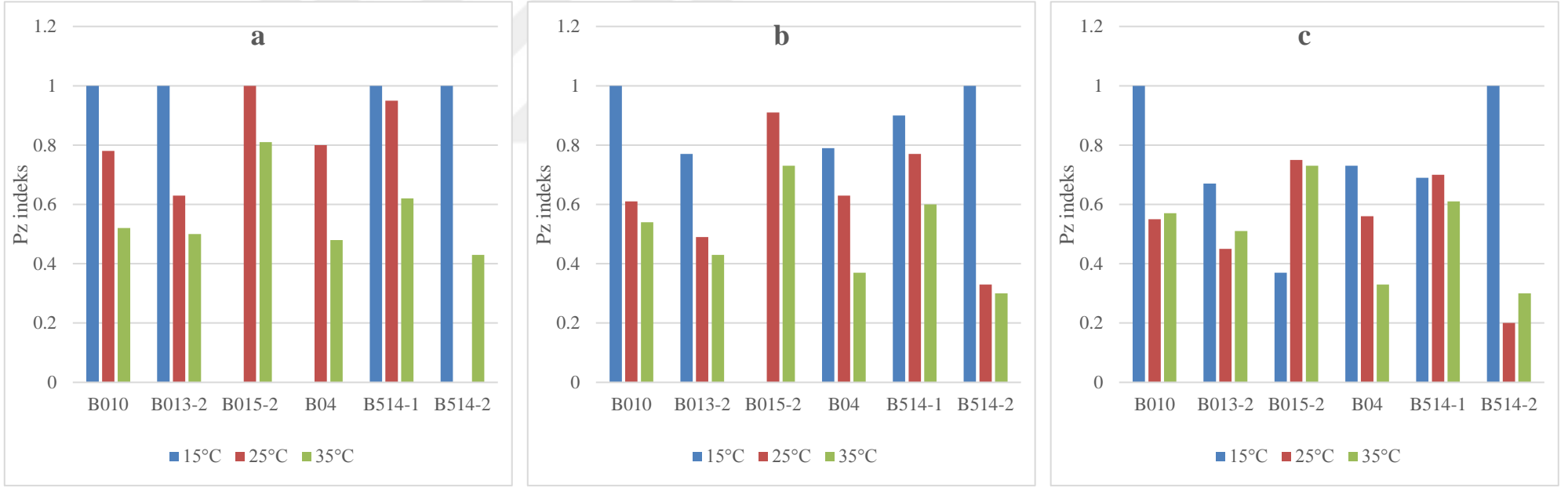
**KÇ:** Koloni Çapı ; **KÇ+HZ:** Koloni Çapı+Hidroliz Zonu ; **Pz İndeks:** Koloni Çapı/(Koloni Çapı+Hidroliz Zonu) ; - : Gelişme yok. <sup>1</sup> : Gelişme görülmeyen suşlar istatistiksel analize dahil edilmemiştir. <sup>a,b</sup> : Her inkübasyon süresi için aynı satırda yer alan değerlerde aynı harf içerenler istatistiksel olarak farklı değildir ( $p > 0,05$ ).

Çizelge 4.3’de yer alan proteolitik aktivite değerleri bulunan SK-21, SK-12 kodlu izolatların 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonucundaki aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunduğu görülmektedir. B015-1, SU-34, SE-42, SBY-7, B04 kodlu izolatların ise 24 saat inkübasyon süresi aktivite değerlerinde istatistiksel olarak önemli fark bulunmaktadır. B013-2 izolatının 48 saat inkübasyon süresi sonucundaki aktivitesi istatistiksel olarak önemli farka sahiptir. 35°C inkübasyon sıcaklığında 27 maya izolatının inkübasyon süresi arttıkça genellikle proteolitik aktivitesinin arttığı görülmektedir. Yapılan çalışma sonucunda proteolitik aktivite gösteren peptitlerin genellikle 2-12 amino asit içeren kısa zincirli peptitler olduğu tespit edilmiştir (Priyanto ve diğ., 2015). Bu nedenle, yüksek proteolitik aktiviteye sahip olan izolatlarda düşük molekül ağırlıklı peptitlerin bulunma olasılığının fazla olduğu öngörülmektedir (Toopcham ve diğ., 2017).

*Yamadazyma* spp.’nin 6 farklı izolatını birbirleriyle karşılatırmak için 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen değerler Şekil 4.4’de yer alan a grafiğinde; 48 saat inkübasyonu b grafiğinde; 72 saat inkübasyonu da c grafiğinde verilmiştir. Elde edilen a grafiğindeki verilere göre 6 farklı *Yamadazyma* spp. izolatının tüm inkübasyon sıcaklıklarına bakıldığında 35°C’deki B514-2 izolatının Pz indeks değerinin en düşük olduğu bu sebeple en yüksek proteolitik aktivite gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Aynı B514-2 izolatı 48 saat inkübasyon sonucunda da en yüksek proteolitik aktiviteye sahiptir. 72 saat inkübasyon sonucunda ise 25°C’deki değerinin en yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

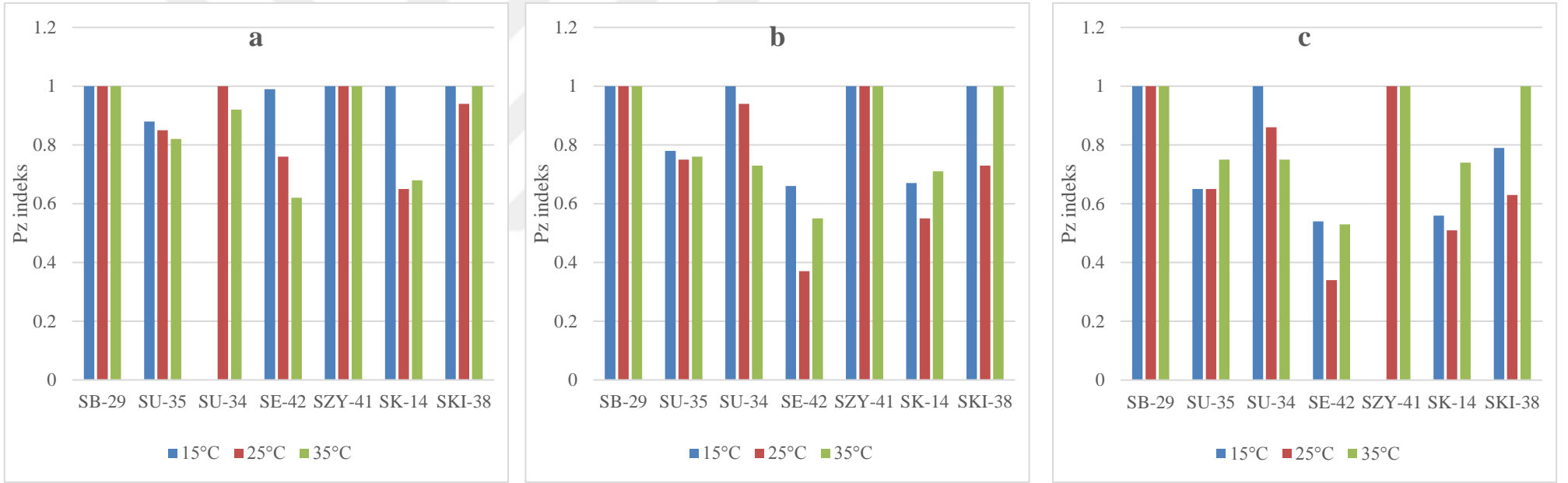
Tüm grafik verileri incelendiğinde ise sıcaklığın proteolitik aktivite üzerinde etkili olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

Literatürde *Yamadazyma* spp.’nin metabolit üretimine dair pek fazla çalışma bulunmamaktadır. Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda; *Yamadazyma terventina*’nın proteolitik aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Ciafardini ve diğ., 2013). *Yamadazyma* spp.’nin çalışıldığı başka bir çalışmada da soğukta gelişen mikroorganizmaların izolasyonu yapılarak 18 adet mayanın soğukta gelişen aktif enzim üretme potansiyelleri incelenmiş ve 4 adet mayada proteolitik aktivite gözlenmiştir. En yüksek proteaz aktivitesi gösteren suşun *Yamadazyma* izolatına ait olduğu ve logaritmik fazın başında ve sonunda yüksek proteaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Daşkaya Dikmen, 2018).



**Şekil 4.4 :** *Yamadazyma* spp.'lerinin proteolitik aktiviteleri.

**a:** 24 saatteki 15,25,35°C sıcaklıklarındaki karşılaştırılması ; **b:** 48 saatteki 15,25,35°C sıcaklıklarındaki karşılaştırılması ; **c:** 72 saatteki 15,25,35°C sıcaklıklarındaki karşılaştırılması



**Şekil 4.5 :** *Hanseniaspora* spp.'lerinin proteolitik aktiviteleri.

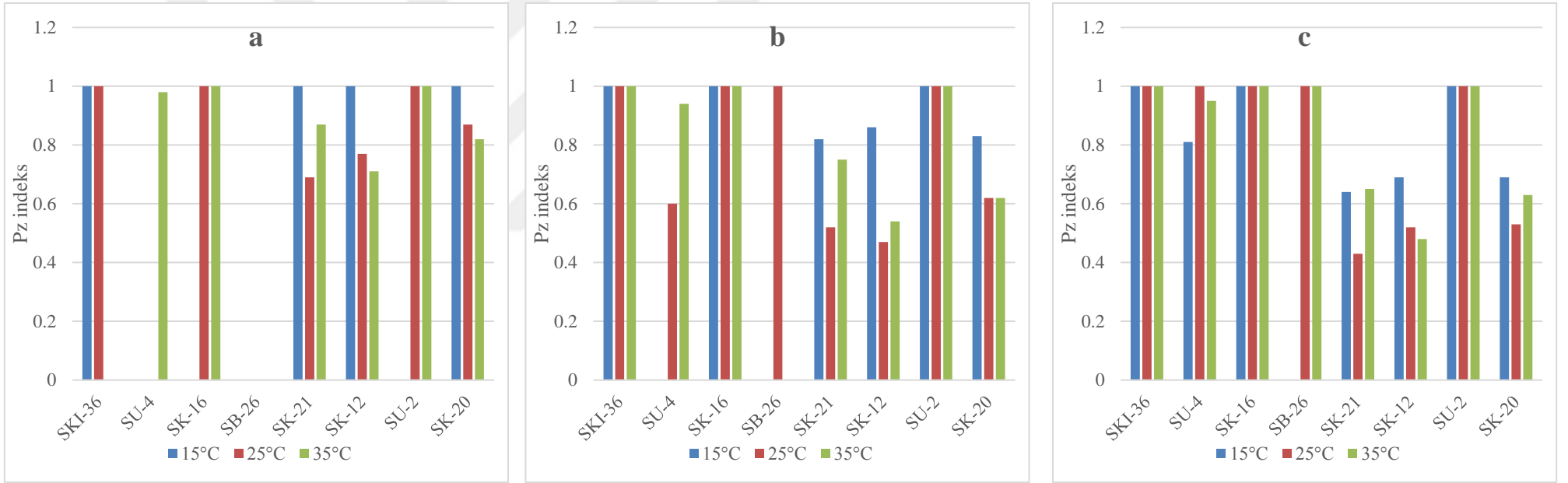
**a:** 24 saatteki 15, 25,35°C sıcaklıklarındaki karşılaştırılması ; **b:** 48 saatteki 15, 25,35°C sıcaklıklarındaki karşılaştırılması ; **c:** 72 saatteki 15, 25,35°C sıcaklıklarındaki karşılaştırılması.

*Hanseniaspora* spp.'nin 7 farklı izolatını birbirleriyle karşılatırmak için 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen değerler Şekil 4.5'de yer alan a grafiğinde; 48 saat inkübasyonu b grafiğinde; 72 saat inkübasyonu da c grafiğinde verilmiştir. Elde edilen a grafiğindeki verilere göre 7 farklı *Hanseniaspora* spp. izolatının tüm inkübasyon sıcaklıklarına bakıldığında 35°C'deki SE-42 izolatının Pz indeks değerinin en düşük olduğu bu sebeple en yüksek proteolitik aktivite gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Aynı SE-42 izolatı 48 saat ve 72 saat inkübasyon sürelerinde 25°C sıcaklığında en yüksek proteolitik aktiviteye ulaştığı görülmüştür.

Tüm grafik verileri incelendiğinde ise sıcaklığın proteolitik aktivite üzerinde etkili olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Tüketime hazır sebzeler, süt ve süt ürünleri, et gibi farklı gıda matrislerinden izole edilen 66 adet *Pseudomonas* suşunun incelendiği bir çalışmada gıda izolatlarının toplamda %49'unun kantitatif analizde proteolitik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Farklı gıda matrisindeki izolatlar arasında farklı proteolitik aktivite tespit edilmiştir. Proteolitik aktivite sebze, süt ve süt ürünleri, et izolatlarında sırasıyla %58, % 47, %30 olarak bulunmuştur (Caldera ve diğ., 2016).

*Metschnikowia* spp.'nin 8 farklı izolatını birbirleriyle karşılatırmak için 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen değerler Şekil 4.6'de yer alan a grafiğinde 48 saat inkübasyonu b grafiğinde; 72 saat inkübasyonu da c grafiğinde verilmiştir. Elde edilen a grafiğindeki verilere göre 8 farklı *Metschnikowia* spp. izolatının tüm inkübasyon sıcaklıklarına bakıldığında 25°C'deki SK-21 izolatının Pz indeks değerinin en düşük olduğu için en yüksek proteolitik aktivite gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. SK-12 izolatı 48 saat inkübasyon süresinde 25°C'de en yüksek proteolitik aktiviteye sahiptir. 72 saat inkübasyon sonucunda da 25°C'deki SK-21 izolatının en yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Chasseriaud ve diğ. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, fermente üzümde kromojenik bir substrat olan azokazein kullanılarak proteolitik aktivite ölçülmüştür. *Metschnikowia pulcherrima* gibi üzümlerde doğal olarak bulunan bazı maya suşları tarafından salgılanan proteazın şarap proteinlerine karşı aktif olduğu görülmüştür. Proteolitik aktivite, azokazein proteolizi aracılığıyla süpernantant içerisine salınan boyanın 440 nm optik yoğunlukta ölçülmesiyle tespit edilmiştir. *Metschnikowia* spp. CRBO L0563, 440 nm'de 0.21'e varan bir artışla en güçlü aktiviteyi göstermiştir. *M. pulcherrima* Y6259 örneğinin sadece 0.17'ye ulaştığı görülmüştür.



**Şekil 4.6 :** *Metschnikowia* spp.'lerinin proteolitik aktiviteleri.

**a:** 24 saatteki 15, 25,35°C sıcaklıklarındaki karşılaştırılması ; **b:** 48 saatteki 15, 25,35°C sıcaklıklarındaki karşılaştırılması ; **c:** 72 saatteki 15, 25,35°C sıcaklıklarındaki karşılaştırılması.



*M. pulcherrima* Y6259 dışındaki tüm suşlar için, proteaz aktivitesi, büyüme fazının başlangıcından itibaren tespit edilmiştir. *M. pulcherrima* Y6259 için proteolitik aktivite sadece büyüme evresinin sonunda tespit edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmaların elde edilen sonuçlarla tutarlı olduğu görülmektedir.

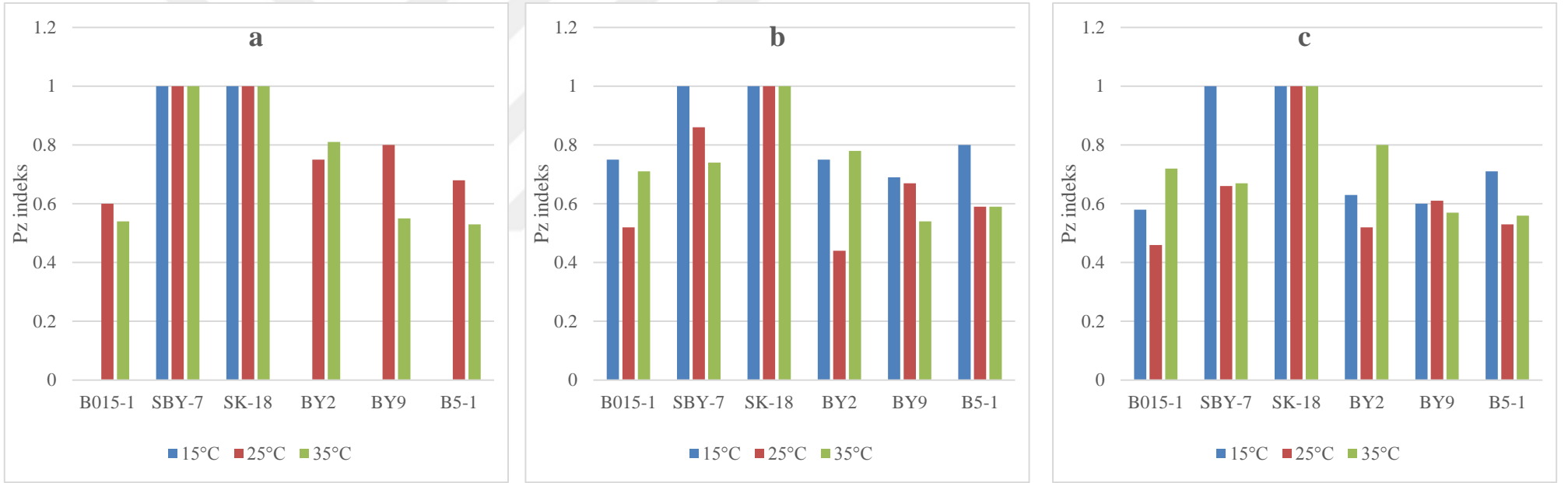
*M. pulcherrima*'nın proteolitik aktivitesi birçok çalışmada da bildirilmiştir (Charoenchai ve diğ., 1997; Fernández ve diğ., 2000; Comitini ve diğ., 2011). Proteaz aktivitesinin yoğunluğunun suşa bağımlı olduğu ve gen sekansıyla alakasız olduğu gösterilmiştir (Reid ve diğ., 2012).

*Cystofilobasidium* spp., *Pichia* spp. ve *Rhodospiridiobolus* spp.'lerini birbirleriyle karşılatırmak için 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen değerler Şekil 4.7'de yer alan a grafiğinde 48 saat inkübasyonu b grafiğinde; 72 saat inkübasyonu da c grafiğinde verilmiştir. Elde edilen a grafiğindeki verilere göre farklı izolatların tüm inkübasyon sıcaklıklarına bakıldığında 35°C'deki B5-1 izolatının Pz indeks değerinin en düşük olduğu için en yüksek proteolitik aktivite gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. BY2 izolatı 48 saat inkübasyon süresinde 25°C'de en yüksek proteolitik aktiviteye sahiptir. 72 saat inkübasyon sonucunda da 25°C'deki B015-1 izolatının en yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Tüm grafik verileri incelendiğinde ise sıcaklığın proteolitik aktivite üzerinde etkili olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

Çizelge 4.4'de mayaların proteaz üretimine sürenin etkisi Duncan çoklu aralık testi ile incelenmiştir. Çizelgede yer alan mayaların proteaz üretimine sürenin etkisinin sonuçlarına bakıldığında farklı sıcaklıkların 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon sürelerinde farklı türlerdeki izolatlarda istatistiksel olarak önemli fark bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır. ( $p < 0,05$ )

Çizelge 4.5' de ise mayaların proteaz üretimine sıcaklığın etkisi Duncan çoklu aralık testi ile incelenmiştir. Çizelgede bulunan tüm mayalar incelendiğinde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri ve farklı sıcaklık değerlerinde 8 mayada istatistiksel önemli fark bulunmadığı sonucu elde edilmiştir. Diğer maya izolatlarında ise proteaz üretimine sıcaklığın etkisinde istatistiksel önemli fark bulunmuştur. ( $p < 0,05$ )



**Şekil 4.7 :** *Cystofilobasidium* spp. ; *Pichia* spp. ; *Rhodosporidiobolus* spp.'lerinin proteolitik aktiviteleri.

**a:** 24 saatteki 15,25,35°C sıcaklıklarındaki karşılaştırılması ; **b:** 48 saatteki 15,25,35°C sıcaklıklarındaki karşılaştırılması ; **c:** 72 saatteki 15,25,35°C sıcaklıklarındaki karşılaştırılması.

**Çizelge 4.4 :** Mayaların proteaz üretimine sürenin etkisinin Duncan çoklu aralık testi ile incelenmesi.

İzolat Kodu	Mikroorganizma	15°C			25°C			35°C		
		24 saat	48 saat	72 saat	24 saat	48 saat	72 saat	24 saat	48 saat	72 saat
B015-1	<i>Cystofilobasidium</i> spp.	-	e	fgh	g	efgh	cde	gh	b	bcd
SB-29	<i>Hanseniaspora</i> spp.	a	a	a	a	a	a	a	a	a
SU-35	<i>Hanseniaspora</i> spp.	b	de	defg	bc	bcd	bc	cde	b	bcd
SU-34	<i>Hanseniaspora</i> spp.	-	a	a	a	bcde	b	ab	b	bc
SE-42	<i>Hanseniaspora</i> spp.	a	f	h	cdef	gh	e	fg	c	efg
SZY-41	<i>Hanseniaspora</i> spp.	a	a	a	a	a	a	a	a	a
SK-14	<i>Hanseniaspora</i> spp.	a	f	gh	efg	cdefgh	bcde	ef	b	bcd
SKI-38	<i>Hanseniaspora</i> spp.	a	a	bc	ab	bc	b	a	a	a
SKI-36	<i>Metschnikowia</i> spp.	a	a	a	a	a	a	-	a	a
SU-4	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	-	b	-	cdefg	a	a	a	a
SK-16	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	a	a	a	a	a	a	a	a
SB-26	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	-	-	-	a	a	-	-	a
SK-21	<i>Metschnikowia</i> spp.	a	cd	defg	defg	defgh	de	abc	b	cdef
SK-12	<i>Metschnikowia</i> spp.	a	bc	def	defg	fgh	bcde	def	c	g
SU-2	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	a	a	a	a	a	a	a	a
SK-20	<i>Metschnikowia</i> spp.	a	cd	def	abc	cdefg	bcde	cde	c	ef
SBY-7	<i>Pichia</i> spp.	a	a	a	a	ab	b	a	b	cde
SK-18	<i>Pichia</i> spp.	a	a	a	a	a	a	a	a	a
BY2	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	-	e	defgh	cde	fgh	bcde	cde	b	b
BY9	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	-	f	efgh	cde	bcdef	bcd	gh	c	efg
B5-1	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	-	cde	cd	defg	cdefg	bcde	gh	c	efg
B010	<i>Yamadazyma</i> spp.	a	a	a	cdef	cdefg	bcde	gh	c	efg
B013-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	a	de	def	fg	efgh	cde	gh	d	fg
B015-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	-	-	ı	a	bc	b	bcd	b	bc
B04	<i>Yamadazyma</i> spp.	-	de	bcd	cd	cdefg	bcde	h	de	h
B514-1	<i>Yamadazyma</i> spp.	a	b	de	ab	abc	b	fg	c	def
B514-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	a	a	a	-	h	f	h	e	h

a,b,c,d,e,f,g,h,ı ; Her inkübasyon sıcaklığı için aynı sütunda (aynı inkübasyon süresi) yer alan değerlerde aynı harfi içerenler istatistiksel olarak farklı değildir. ( $p > 0,05$ )

**Çizelge 4.5 : Mayaların proteaz üretimine sıcaklığın etkisinin Duncan çoklu aralık testi ile incelenmesi.**

İzolat Kodu	Mikroorganizma	24 saat			48 saat			72 saat		
		15°C	25°C	35°C	15°C	25°C	35°C	15°C	25°C	35°C
B015-1	<i>Cystofilobasidium</i> spp.	-	a	a	a	b	a	b	c	a
SB-29	<i>Hanseniaspora</i> spp.	a	a	a	a	a	a	a	a	a
SU-35	<i>Hanseniaspora</i> spp.	a	a	a	a	a	a	a	a	a
SU-34	<i>Hanseniaspora</i> spp.	-	a	a	a	a	a	a	a	a
SE-42	<i>Hanseniaspora</i> spp.	a	b	c	a	a	a	a	a	a
SZY-41	<i>Hanseniaspora</i> spp.	a	a	a	a	a	a	a	a	a
SK-14	<i>Hanseniaspora</i> spp.	a	b	b	a	b	a	b	b	a
SKI-38	<i>Hanseniaspora</i> spp.	a	a	a	a	b	a	b	b	a
SKI-36	<i>Metschnikowia</i> spp.	a	a	-	a	a	a	a	a	a
SU-4	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	-	a	-	b	a	a	a	a
SK-16	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	a	a	a	a	a	a	a	a
SB-26	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	-	-	-	a	-	-	a	a
SK-21	<i>Metschnikowia</i> spp.	a	c	b	a	c	b	a	b	a
SK-12	<i>Metschnikowia</i> spp.	a	b	b	a	b	b	a	a	a
SU-2	<i>Metschnikowia</i> spp.	-	a	a	a	a	a	a	a	a
SK-20	<i>Metschnikowia</i> spp.	a	ab	b	a	b	b	a	a	a
SBY-7	<i>Pichia</i> spp.	a	a	a	a	b	c	a	b	b
SK-18	<i>Pichia</i> spp.	a	a	a	a	a	a	a	a	a
BY2	<i>Rhodosporidiobolus</i> spp.	-	a	a	a	b	a	b	c	a
BY9	<i>Rhodosporidiobolus</i> spp.	-	a	b	a	a	b	a	a	a
B5-1	<i>Rhodosporidiobolus</i> spp.	-	a	a	a	b	b	a	b	b
B010	<i>Yamadazyma</i> spp.	a	b	c	a	b	b	a	b	b
B013-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	a	b	c	a	b	b	a	b	b
B015-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	-	a	a	-	a	a	b	ab	a
B04	<i>Yamadazyma</i> spp.				a	b	c	a	b	c
B514-1	<i>Yamadazyma</i> spp.	a	a	b	a	b	c	a	a	a
B514-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	a	-	b	a	b	b	a	b	b

<sup>a,b,c</sup> : Her maya izolatu için aynı inkübasyon süresinde aynı satırda yer alan değerlerde aynı harfi içerenler istatistiksel olarak farklı değildir. ( $p>0,05$ )

Çizelge 4.6' da yer alan sonuçlara bakıldığında 27 adet mayanın Pz indeksleri değerlerine göre izolatların dağılımı görülmektedir.

**Çizelge 4.6 : Pz indeksi değerlerine göre maya izolatlarının dağılımı.**

27 suşun proteolitik aktivitesi		15°C			25°C			35°C		
		24	48	72	24	48	72	24	48	72
Pz indeksi		saat	saat	saat	saat	saat	saat	saat	saat	
Proteaz										
Yüksek	<0,40	0	0	1	0	2	2	0	2	2
Orta	0,41-0,60	0	0	4	1	8	10	7	7	6
Düşük	0,61-0,80	0	9	10	10	7	6	4	9	10
Çok düşük	0,81-0,99	2	4	1	4	3	1	7	1	1
Yok	1	14	11	10	9	7	8	7	7	8
Gelişmeyen m/o		11	3	1	3	0	0	2	1	0

**Pz İndeks:** Koloni Çapı/(Koloni Çapı+Hidroliz Zonu)

15°C’de 24 saat inkübasyon sonucunda %51,9 unun 1 Pz indeksi değerinde olduğu; 48 saat inkübasyonu sonucunda değerlerinin yoğunlukla 0,61-0,80 aralığı ve 1 Pz indeksi değeri sonucunda bulunduğu; 72 saat inkübasyon sonucunda yüksek proteolitik aktivite gösteren (<0,40) 1 adet izolatın bulunduğu görülmektedir. 72 saat inkübasyon sonucunda yer alan değerlerin %37 sinin 0,61-0,80 aralığında ve 1 Pz indeksi değerinde yer aldığı sonucu elde edilmiştir.

25°C’de 24 saat inkübasyon sonucunda yer alan değerlerde %37 sinin düşük proteolitik aktivite değeri olan 0,61-0,80 aralığında yer aldığı; %33,3 ünün proteolitik aktivite olmayan 1 Pz indeksi değerinde olduğu ve orta proteolitik aktivite değerine sahip 1 adet izolatın bulunduğu görülmektedir. 48 saat inkübasyonu sonucunda değerlerin yoğunlukla 0,41-0,60; 0,61-0,80 aralığı ve 1 Pz indeksi değerinde olduğu sonucuna ulaşılmıştır. 2 maya izolatının ise yüksek aktivite değeri aralığında olduğu bulunmuştur. 72 saat inkübasyon sonucunda da yüksek proteolitik aktivite gösteren (<0,40) 2 adet izolatın bulunduğu görülmektedir. 72 saat inkübasyon sonucunda yer alan değerlerin %37 sinin orta proteolitik aktivite aralığında ve 1 Pz indeksi değerinde yer aldığı sonucu elde edilmiştir.

35°C’ de 24 saat inkübasyon sonucunda elde edilen veriler orta, çok düşük ve aktivite olmayan 1 Pz indeksi değerlerinde yoğun olduğu görülmektedir. 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda 2 maya izolatının yüksek aktivite değeri aralığında olduğu bulunmuştur. Diğer değerlerin ise genellikle orta, düşük proteolitik aktivite aralığında ve 1 Pz indeksi değerinde yer aldığı bulunmuştur. Galán-Ladero ve diğ. (2010) tarafından *Candida tropicalis*’ in 29 suşunun 37°C ve 22°C’de ve 24, 48, 72 saat sürelerinde hemoliz, aspartil proteaz, fosfolipaz ve esteraz enzimatik aktivitelerinin Pz indeksi değerlerinin incelendiği bir çalışmada 37°C’ de ve 24 saatte, suşların çoğunda (28/29) çok düşük proteaz aktivitesi elde edilirken, 72 saatte suşların yarısı orta

düzye de aktivite (0,41-0,60) göstermiştir. 22°C'de ise düşük aktivite görülmüştür. *Candida* spp.'de aspartil proteaz aktivitesi ile ilgili literatürde birçok çalışma bulunmaktadır (Fotedar & Al-Hedaithy, 2005; Trofa ve diğ., 2008). Kantarcioğlu & Yücel (2002) tarafından elde edilen sonuçlarda da benzer değerler elde edilmiştir. Yamamoto ve diğ. (1992) ise 18 suşun 13'ünde proteolitik aktivite elde etmişlerdir.

Henrique ve diğ. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, *Cryptococcus neoformans*'ın klinik ve çevresel izolatları arasındaki proteinaz ve fosfolipaz enzimlerini üretme oranları karşılaştırılmıştır. Klinik ve çevresel kökenli *Cryptococcus neoformans*'ın 78 izolatu test edilmiştir. Klinik orjinli suşlarda fosfolipaz üretim oranının proteinaz üretim oranından daha fazla olduğu bulunmuştur. Çevresel orjinli izolatlar arasında böyle bir fark bulunmamıştır.

#### 4.2 Süpernatantların ADE İnhibitör Aktivitesi

Tez çalışması kapsamında yapılan analizler sonucunda proteolitik aktivitesi belirlenen 13 farklı mayanın 25°C' de 24 ve 48 saat sonucundaki % ADE inhibisyon aktiviteleri çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.7 :** Maya izolatlarının ADE inhibisyon aktivitesi.

İzolat Kodu	Mikroorganizma	ADE inhibisyon aktivitesi (%)	
		24 saat	48 saat
B015-1	<i>Cystofilobasidium</i> spp.	20,77±3,84 <sup>aDEF</sup>	19,50±7,32 <sup>aC</sup>
SE-42	<i>Hanseniaspora</i> spp.	8,78±3,37 <sup>bG</sup>	17,60±0,83 <sup>aCD</sup>
SK-14	<i>Hanseniaspora</i> spp.	8,60±2,06 <sup>bG</sup>	20,53±3,00 <sup>aBC</sup>
SU-34	<i>Hanseniaspora</i> spp.	18,98±4,04 <sup>aEF</sup>	17,94±9,62 <sup>aCD</sup>
SU-4	<i>Metschnikowia</i> spp.	17,41±10,11 <sup>aCDEF</sup>	21,57±6,33 <sup>aCD</sup>
SK-20	<i>Metschnikowia</i> spp.	31,66±3,28 <sup>aAB</sup>	22,42±2,39 <sup>bBC</sup>
B5-1	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	22,95±5,53 <sup>aBCDEF</sup>	8,60±1,93 <sup>bD</sup>
BY9	<i>Rhodospiridiobolus</i> spp.	27,75±6,48 <sup>aABCDE</sup>	14,63±0,55 <sup>bCD</sup>
B010	<i>Yamadazyma</i> spp.	20,08±9,44 <sup>bEF</sup>	36,12±9,68 <sup>aA</sup>
B013-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	31,34±3,89 <sup>aABC</sup>	30,10±9,49 <sup>aAB</sup>
B04	<i>Yamadazyma</i> spp.	21,63±3,01 <sup>aFG</sup>	18,44±4,85 <sup>aBC</sup>
B514-1	<i>Yamadazyma</i> spp.	34,62±7,00 <sup>aA</sup>	19,57±6,41 <sup>bC</sup>
B514-2	<i>Yamadazyma</i> spp.	30,43±4,85 <sup>aABCD</sup>	14,29±2,24 <sup>bCD</sup>

<sup>a,b</sup> : Her izolat için aynı satırda yer alan değerlerde aynı harf içerenler istatistiksel olarak farklı değildir. ( $p > 0,05$ )

<sup>A,B,C,D,E,F,G</sup> : Her inkübasyon süresi için aynı sütunda yer alan değerlerde aynı harf içerenler istatistiksel olarak farklı değildir. ( $p > 0,05$ )

Mikrobiyal fermantasyon sonrasında elde edilen süpernatantların anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitör aktivitelerinin değerlendirilmesi için spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Süpernatantta var olduğu düşünülen peptitlerin inhibitör aktivitesine bağlı olarak ADE çalışması reaksiyon ortamında engellenmekte ve hippuril-L-histidil-L-lösin (HHL) substratının hippürik aside dönüşümü önlenmektedir. İşlem sonunda oluşan hippürik asit miktarı spektrofotometrik olarak ölçülerek izolatların % ADE inhibisyon aktiviteleri hesaplanmaktadır. Çizelge 4.7’de görüldüğü üzere hidroliz süresindeki artışa bağlı olarak izolatların ADE inhibitör aktivitelerinin genellikle azaldığı gözlenmiştir. SE-42, SK-14, SU-4 ve B010 izolatlarında ise ADE inhibisyon aktivitelerinde zamana bağlı artış olduğu gözlenmiştir. 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda ise farklı mayaların istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. 24 saat inkübasyon sonucunda ADE inhibisyon aktivitesi en yüksek olan izolatın B514-1 izolatı olduğu görülmüştür. 48 saat inkübasyon sonucunda ise B010 kodlu izolatın en yüksek ADE aktivitesi gösterdiği sonucu elde edilmiştir.

#### **4.2.1 ADE inhibitör aktivitesinin değerlendirilmesi**

Peptitlerin zincir uzunlukları, amino asit sekansları ve bileşimleri ADE inhibisyonu üzerinde etkili faktörlerdir (Hernández-Ledesma ve diğ., 2011; Aluko, 2015). ADE inhibisyon aktiviteleri ile ilgili literatürdeki çalışmalarda uzun zincirli, büyük molekül ağırlıklı peptitlerin ADE’nin aktif bölgesine bağlanamadığı bildirilmiştir (Natesh ve diğ., 2003; Jakubczyk ve diğ., 2013). Literatürde yapılan incelemeler sonucunda ADE inhibitör aktivite gösteren peptitlerin genellikle 2-12 amino asit içeren kısa zincirli peptitler olduğu tespit edilmiştir (Gu & Wu, 2013; Priyanto ve diğ., 2015; Sornwatana ve diğ., 2015; Wang ve diğ., 2018). Bu nedenle yüksek ADE inhibitör aktiviteye sahip olan izolatlarda düşük molekül ağırlıklı peptitlerin bulunma olasılığının fazla olduğu düşünülmektedir (Toopcham ve diğ., 2017; Dikmen, 2018).

Öte yandan uzun zincirli peptitlerin de ADE inhibisyonu sağladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu durum peptit bileşiminde bulunan amino asitlerin özellikleri ile açıklanmaktadır. Aspartik asit ve glutamik asit gibi asidik amino asitler peptitin negatif yüklü olmasına sebep olabilir. Negatif yüklü peptit ile ADE’de bulunan çinkonun şelat oluşturmasına bağlı enzimin çalışması engellenebilir (Aluko, 2015).

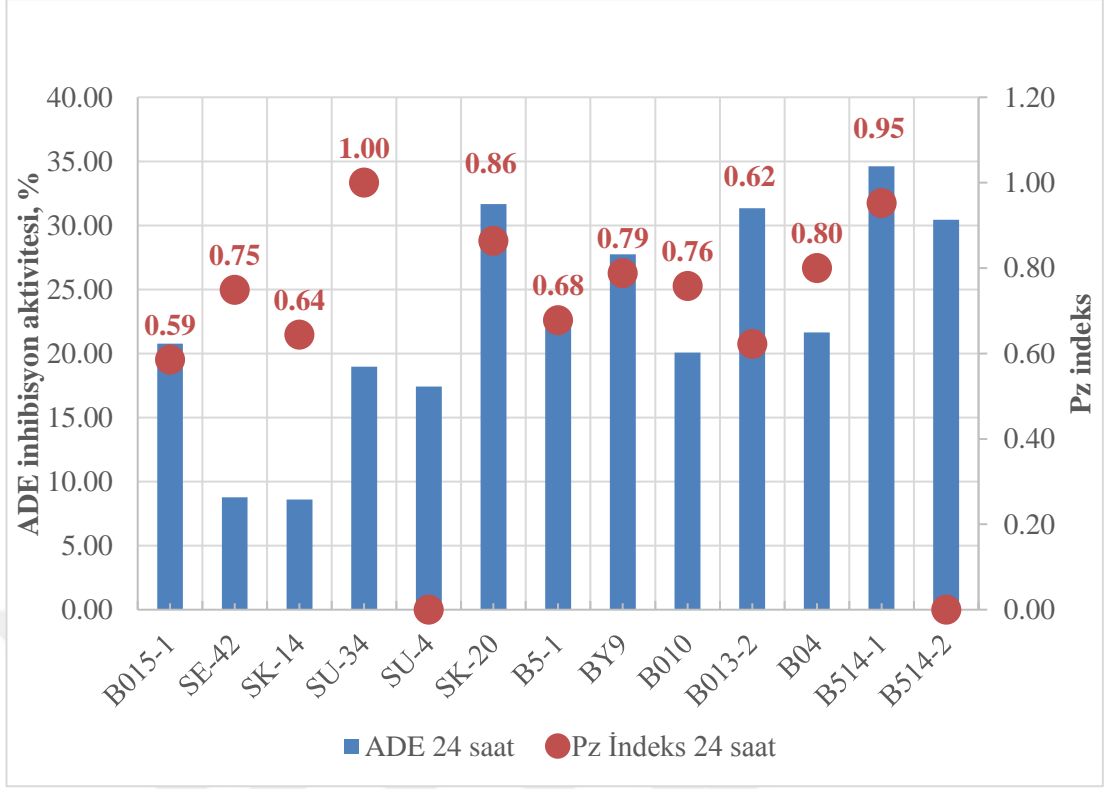
ADE inhibitör peptitlerin genel olarak amino ve karboksi ucunda bazı spesifik amino asitleri içerdikleri bildirilmektedir (Iwaniak ve diğ., 2014). Literatürde yapılan çalışmalarda tirozin, triptofan, prolin, lisin, izolösin, valin, lösin ve arginin amino asitlerini içeren peptitlerin daha yüksek ADE inhibitör aktivite gösterdiği bulunmuştur (López-Fandiño ve diğ., 2006; Guang & Phillips, 2009; Gu & Wu, 2013). ADE inhibitör aktivite gösteren farklı uzunluklarda ve bileşimde birçok peptit bulunmaktadır (Wu ve diğ., 2006). Dipeptit, tripeptit ve tetrapeptitlerden daha uzun peptitlerde inhibisyon etkisi karboksi ucunda bulunan amino asitlerle ilişkilendirilmektedir (Iwaniak ve diğ., 2014). Ceviz proteini hidrolizatlarından izole edilen ADE inhibitör peptitin aktivitesine bileşiminde bulunan hidrofobik amino asitler (triptofan ve prolin), pozitif yüklü amino asitler ve aromatik amino asitlerin katkı sağlamış olabileceği bildirilmiştir (Liu ve diğ., 2013). Pirinç kabuğu proteininden elde edilen YSK sekanslı kısa zincirli peptitin ADE aktif bölgesi ile çok güçlü hidrojen bağı oluşturduğu bildirilmiştir (Wang ve diğ., 2017).

24 ve 48 saatte incelenen izolatlar arasında 24 saat izolatlarının ADE inhibisyon aktivitelerinin daha yüksek olduğu süreye bağlı olarak bazı izolatların ADE inhibisyon etkisinde azalmaların olduğu görülmektedir. Tez çalışmasında da yüksek değere sahip hidrolizatların ADE inhibisyon etkisinin kısa hidroliz süresine bağlı olarak oluşabilecek düşük molekül ağırlıklı peptit içerikleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

#### **4.3 İzolatların proteolitik aktiviteleri ile ADE inhibitör aktivitelerinin karşılaştırılması**

Şekil 4.8’de 13 farklı maya izolatının 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen ADE inhibisyon aktiviteleri ve Pz indeks değerleri karşılatırılmıştır. 24 saat inkübasyon süresi sonunda yüksek ADE inhibitör etkinliği gözlemlenen B514-1 numaralı *Yamadazyma* spp. izolatının Pz indeks değerinin 0,95 olduğu görülmüştür. Aynı inkübasyon koşullarında en yüksek proteolitik aktiviteye sahip izolatın ise 0,59 Pz indeks değeriyle B015-1 *Cystofilobasidium* spp. izolatı olduğu ve ADE inhibitör aktivitesinin ise %20,77 olduğu görülmüştür. En düşük ADE aktivitesine sahip izolat ise SK-14 kodlu *Hanseniaspora* spp. olup Pz indeksi 0,64’tür. Bu durum ilgili izolatların ürettiği proteaz ve diğer metabolitlerle ilişkilendirilebilir.



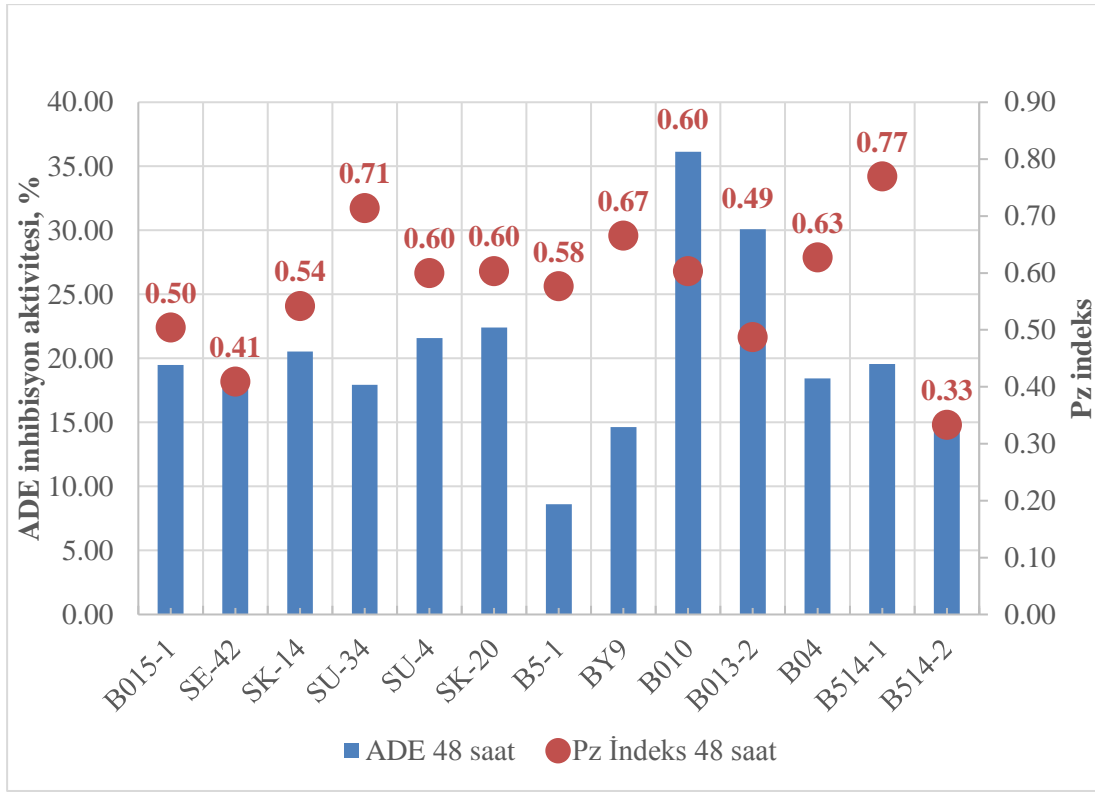


**Şekil 4.8 :** Seçilen maya izolatlarının 24 saat Pz indeks ve ADE inhibisyon aktiviteleri karşılaştırması.

Literatürde belirtildiği üzere enzimatik hidrolizde kullanılan proteaz, reaksiyon sonucunda elde edilecek peptitin sekansı ve biyoaktivitesi üzerinde etkilidir (Daskaya-Dikmen ve diğ., 2017).

Şekil 4.9’da 13 farklı maya izolatının 48 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen ADE inhibisyon aktiviteleri ve Pz indeks değerleri karşılatırlmıştır. 48 saat inkübasyon süresi sonunda en yüksek ADE inhibitör aktivitesi gösteren izolatın B010 *Yamadazyma* spp. olduğu ve Pz indeksinin 0,60 olduğu görülmüştür. Aynı inkübasyon koşullarında en yüksek proteolitik aktiviteye sahip izolatın ise 0,33 Pz indeks değeriyle B514-2 *Yamadazyma* spp. izolatı olduğu ve ADE inhibitör aktivitesinin ise %14,29 olduğu görülmüştür. En düşük ADE aktivitesine sahip izolat ise B5-1 kodlu *Rhodospordiobolus* spp. olup Pz indeksi 0,58’dir.

Alkalaz, flavourzyme, termolizin, tripsin, kimotripsin, pepsin, papain, nötraz, bakteriyel ve fungal proteazlar gibi farklı proteolitik enzimlerin proteinleri hidrolize ettiği bildirilmektedir (Chiang ve diğ., 2006; Thewissen ve diğ., 2011; Gu & Wu, 2013; He ve diğ., 2013).



**Şekil 4.9** : Seçilen maya izolatlarının 48 saat Pz indeks ve ADE inhibisyon aktiviteleri karşılaştırması.

Kullanılan enzimden bağımsız olarak, sıcaklık, hidroliz süresi ve enzim/protein oranı, ADE inhibe edici aktiviteye sahip peptit üretiminde önemli faktörler olarak kabul edilir (Chiang ve diğ., 2006; Cheung ve diğ., 2009; García ve diğ., 2015; Priyanto ve diğ., 2015). Proteolitik enzimin substrata özgülüğü nedeniyle, hidrolizatların peptit bileşimi ve dolayısıyla ADE inhibe edici aktiviteleri değişmektedir (Van der Ven ve diğ., 2002; He ve diğ., 2013). ADE inhibe edici peptitler genellikle kısa zincirli olduğundan, enzimler yüksek hidroliz derecesine sahip olmalıdır (Espejo-Carpio ve diğ., 2013; De Gobba ve diğ., 2014). En uygun sıcaklık ve pH, enzime bağlı olarak farklılık gösterebilir. Örneğin alkalaz (Qu ve diğ., 2013) için 50°C ve pH 9.0, flavourzyme (Bao ve diğ., 2016) için 50°C ve pH 6.0 ve termolizin (García ve diğ., 2015) için 50°C pH 8,0 ve papain (Mohan ve diğ., 2016) için 65°C ve pH 7.0 şeklindedir. Alcalaz ve termolisin, diğer proteolitik enzimlerden daha yüksek ADE inhibe edici aktif peptitler üretme yeteneğine sahiptir (Chiang ve diğ., 2006; Pihlanto ve diğ., 2008; Ambigaipalan ve diğ., 2015; Priyanto ve diğ., 2015; García ve diğ., 2015; Mäkinen ve diğ., 2016; Bao ve diğ., 2016). C-terminal amino asitlerde Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Trp ve Met gibi zengin hidrofobik amino asit içeriğine sahip olan peptitler, bölünme tercihinden dolayı alkalaz ile elde edilebilir (Lourenço da Costa ve

diğ. 2007). Termolizin söz konusu olduğunda, Trp, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val, Ala veya Met gibi hidrofobik N-terminal amino asitlerin peptitlerin aktivitesi için önemli olduğu bilinmektedir (Arnold ve diğ., 1996).

Bazı çalışmalarda enzimlerin kombinasyonu enzim özgüllüğü nedeniyle potansiyel ADE inhibe edici peptitlerin etkisini arttırmak için kullanılmaktadır (Majumder & Wu, 2010; Ambigaipalan ve diğ., 2015). Sadece termolizin ve termolizin-pepsin kombinasyonu ile sindirilen soya proteininin ADE inhibe edici aktivitelere sahip olduğu ve sırasıyla IC50 değeri 51.8 µg/mL ve 53.6 µg/mL olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, termolisin, pepsin ve tripsin üçlü kombinasyonu kullanılarak, 115.6 µg/mL'lik daha yüksek bir IC50 değeri elde edilmiştir. Bu nedenle, tripsinin soya fasulyesinin ADE-inhibitör aktivitesini daha fazla etkilediği gözlenmiştir (Gu & Wu, 2013). Bu sebeple, iki veya daha fazla enzimin kombinasyonu tek enzimatik işlemden daha yüksek ADE önleyici aktivite gösterebilir.

ADE inhibe edici peptitlerin enzimatik üretiminde yüksek verim elde etmek için yüksek basınç (HP), ultrason ve mikrodalga gibi yeni teknikler kullanılarak araştırmalar yapılmaktadır (Hernández-Ledesma ve diğ., 2011; Qu ve diğ., 2012; Otağ & Hayta, 2016). Garcia-Mora ve diğ. (2015) kısa zincirli (<3 kDa) daha fazla peptit elde ederek, HP'nin lentil hidrolizatlarının ADE-inhibitör aktivitesini arttıran farklı enzimler ile proteolize yardım ettiğini göstermiştir. HP'nin, enzimlerin substrata daha yüksek erişilebilirliği ve yeni hedef amino asitlerin ortaya çıkması nedeniyle biyoaktif dizilerin salınımını desteklediği sonucuna varılmıştır (Garcia-Mora ve diğ., 2015). HP uygulamasına benzer şekilde, ultrason teknikleri de enzimatik süreçte kullanılmaktadır (Jia ve diğ., 2010; Qu ve diğ., 2013). ADE inhibisyonunda önemli bir role sahip olan bir C-terminal hidrofobik amino asite sahip daha fazla peptit, ultrasonik işlemle elde edilebilir, çünkü bu ön işlem daha fazla hidrofobik grup ve moleküllerin içindeki bölgelerin dışarı çıkmasına neden olur (Jia ve diğ., 2010). Başka bir çalışmada, Otağ ve Hayta (2016) tarafından enzimatik hidrolizle nohut kaynaklı peptidlerin ADE inhibe edici aktivitesi üzerinde mikrodalğanın etkisi araştırılmış ve mikrodalga işlemi gören numunelerde daha yüksek ADE inhibitör aktivitesi bulunmuştur (aktivite % 4,5 oranında artmıştır).

Yukarıda açıklanan yöntemlere ek olarak, ADE inhibe edici peptitler, proteolitik aktiviteye sahip kültürler kullanılarak fermantasyon yoluyla elde edilebilir (Hayes ve diğ., 2007). ADE inhibitörü peptit fermantasyonu için laktik asit bakterileri (LAB) genellikle başlangıç kültürü olarak kullanılır (Hayes ve diğ., 2007; Rizzello ve diğ.,

2008; Jakubczyk ve diğ., 2013; Nejati ve diğ., 2013; Shu ve diğ., 2015). Bununla birlikte, yapılan araştırmalar *Bacillus* spp. gibi LAB dışındaki mikroorganizmaların da olduğunu gostermektedir (Lee ve diğ., 2015; Moayedi ve diğ., 2016). *Staphylococcus vitulus* (Fernández ve diğ., 2016), *Saccharomyces cerevisiae* (Vermeirssen ve diğ., 2003; Jakubczyk ve diğ., 2013; Daskaya-Dikmen ve diğ., 2017) *Debaryomyces hansenii* (García-Tejedor ve diğ., 2015), *Mucor* spp. (Hang & Zhao, 2012) ve *Aspergillus* spp. (Wang ve diğ., 2008) de başlangıç kùltürleri olarak kullanılabilir.

Başlangıç kùltürleri, fermentasyon koşulları ve inokulum seviyeleri, ADE inhibe edici peptit üretiminde önemli rol oynar (Jakubczyk ve diğ., 2013; Shu ve diğ., 2015; Fernández ve diğ., 2016). Shu ve diğ. (2015) *Lactobacillus plantarum* ile fermente edilmiş bezelye (Jakubczyk ve diğ., 2013) ve *Mucor* spp. tarafından fermente edilen mao-tofudaki (Hang & Zhao, 2012) gibi *Lactobacillus plantarum* tarafından fermente edilen sütte de ADE inhibitör aktivitesinin, fermentasyon süresi ile arttığını bildirmiştir.

Yüksek inokulum seviyesi ADE inhibe edici peptitlerin ayrışmasına sebep olduğundan dolayı; inokulum seviyesine bağlı olarak ADE inhibe edici aktivitenin değiştiği bildirilmiştir (Shu ve diğ., 2015). Fermentasyon koşullarına ve inokulum seviyesine ek olarak, kullanılan suř veya farklı kùltürlerin birlikte kullanılması da ADE inhibe edici peptit üretiminde önemli bir rol oynar. *Pichia kudriavzevii*, *Enterococcus faecalis* ve *Lactobacillus plantarum* ortak kùltürleriyle fermentasyonun düşük acılıkta ve düşük IC50 değeri (30.63  $\mu$ g / mL) gosteren ADE inhibe edici peptitler ürettiği bildirilmiştir (Chaves-López ve diğ., 2014).

Peptidin ADE inhibe edici aktivitesi, hidrofobik amino asit içeriği, Trp ve Pro ile ilişkilidir. Pozitif yüklü amino asitler ve aromatik amino asitler, peptitlerin ADE inhibe edici aktivitesine katkıda bulunabilir (Liu ve diğ., 2013). N-terminalindeki alifatik ve hidrofobik tortular, ortada bir bazık arginin ve C-terminalindeki bir aromatik tirozin, peptidin ADE inhibe edici aktivitesini arttırabilir (Moayedi ve diğ., 2016). ADE inhibe edici aktivite ile peptit yapısı arasındaki ilişki tam olarak açıklanmamasına rağmen, peptidin inhibe edici potansiyelinin yapısal ve kompozisyon özelliklerine bağlı olduğu sonucuna varmak mümkündür.

ADE inhibitör aktivitesi çeşitli substratlar, ortamlar ve analitik teknikler kullanılarak farklı yöntemlerle ölçùlmektedir (Thewissen ve diğ., 2011; Sornwatana ve diğ., 2015; Garcia-Mora ve diğ., 2015; Daskaya-Dikmen ve diğ., 2017). Bunların arasında en çok kullanılan yöntem, 1971'de Cushman ve Cheung tarafından geliştirilmiştir. ADE'nin

etkisiyle hippuril-L-histidil-L-ösinin (HHL) etil asetat ekstraksiyonuyla oluşan hippürük asit (HA) konsantrasyonunun 228 nm'de spektrofotometre ile belirlenmesine dayanır (Daskaya-Dikmen ve diğ., 2017). Bu analiz basit ve ekonomik olsa da, bildirilen bazı sınırlamalar vardır. 228 nm'de de güçlü bir şekilde absorbe olan hidrolize edilmemiş HHL'nin etkileşimi, ADE aktivitesinin fazla tahmin edilmesine neden olabilir (Li ve diğ., 2005). Ayrıca, karmaşık peptit karışımlarına uygulandığında, karışan moleküller de yanlış ölçümlere neden olabilir (Boschin ve diğ., 2014). Substrat açısından, N- (3- (2-furil) akrilol) -l-fenilalanilglisilglisin (FAPGG) veya 3-hidroksibutirilglisil-glisil-glisin (3HB-GGG), HHL'ye alternatif olarak kullanılabilir (Lam ve diğ., 2007; Thewissen ve diğ., 2011).





## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalarda Türkiye’den izole edilen 27 adet mikroorganizma kullanılmıştır. Tüm izolatlar 15°C, 25°C ve 35°C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta 24, 48, 72 saat inkübasyon koşullarında Yadav ve diğ. (2016) tarafından önerilen bazal besiyerinde geliştirilerek Galán-Ladero ve diğ. (2010) tarafından kullanılan ölçüm sonuçlarına göre proteolitik aktiviteleri belirlenmiştir.

Çevresel örnekler ve meyvelerden izole edilen 27 izolattan 25°C’ de 24 saat inkübasyonu sonucunda en yüksek proteolitik aktiviteye sahip izolatın (Pz indeks: 0,60) B015-1 *Cystofilobasidium* spp. olduğu; 48 saat inkübasyon sonucunda (Pz indeks: 0,33) B514-2 *Yamadazyma* spp. izolatu olduğu ve 72 saat inkübasyonu sonucunda da (Pz indeks: 0,20) B514-2 *Yamadazyma* spp. izolatının en yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu sonucu elde edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise farklı proteolitik aktiviteye sahip izolatlar yağsız süt ortamında farklı sürelerde fermantasyona bırakılarak ADE inhibisyon aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Yapılan analizler sonucunda, 24 saat sonunda en yüksek ADE inhibitör aktivitesi (% 34,62±7,00) B514-1 numaralı *Yamadazyma* spp. izolatında görülmüştür. 48 saat sonunda en yüksek ADE inhibitör aktivitesi (% 36,12±9,68) B010 kodlu *Yamadazyma* spp. izolatında belirlenmiştir.

Tez çalışması sonucunda yerel izolatların ADE inhibisyon aktivitesi gösterdiği, gıda protein kaynaklı ADE inhibitör peptitlerin tıp, gıda vb. alanlarda kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir. İzolatların ADE inhibitör aktiviteleri çok yüksek değildir. Yapılacak optimizasyon çalışmaları ile aktivitenin artırılabilceği öngörülmektedir. ADE inhibe edici peptidler için diğer önemli konu ise gastrointestinal sindirim ve emilim sırasında aktif kalmaları ve biyolojik etkinliklerini göstermek için kardiyovasküler sisteme ulaşmaları gerekmektedir. ADE inhibe edici aktivite, amino asit kompozisyonu ve peptitlerin zincir uzunluğu tarafından etkilenebilir. Prolin ve hidroksprolin içeren peptidlerin ve C-terminal prolin-prolin

içeren tripeptitlerin sindirim enzimleri tarafından bozulmaya karşı dirençli olduğu bilinmektedir.

ADE inhibe edici peptitlerin etkileri konusunda birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, çalışmaların çoğu süt peptidleri üzerinde yapılmıştır. Farklı protein kaynaklarının da ADE inhibe edici peptit üretme potansiyelleri açısından araştırılmaya elverişli konular arasında bulunduğu öngörülmektedir. Ayrıca, gıda ve ilaç endüstrisi için peptidlerin üretilmesi için ölçek büyütme çalışmaları da gereklidir. ADE inhibe edici peptitler üzerinde yapılan çalışmalar genellikle laboratuvar ölçeğinde yapılmaktadır. Fakat bu peptidleri sanayileştirmek için ölçek büyütme/pilot ölçek çalışmaları gereklidir. ADE inhibe edici peptitlerin sanayileşmesi, sentetik ilaçlara bir alternatif olarak önemli olduğundan, daha fazla ölçeklendirme çalışması yapılması gerekir. Bu çalışmalara bağlı olarak, ADE inhibe edici peptitleri besin takviyesi olarak kullanmak ve/veya bunları diğer gıda ürünlerine dahil etmek mümkün olacaktır. Peptitlerin gıda ürünlerine dahil edilmesinde önemli olan bir diğer nokta ise ADE inhibe edici peptitlerin acılığıdır. Acı tadı ADE inhibe edici peptitlerden çıkarmak için farklı teknikler geliştirilmiştir ve peptitlerin kapsüllenmesi, peptitlerin acı tadını maskelemek için kullanılan en uygun teknik olarak bildirilmektedir. Bununla birlikte, düşük acılığa sahip ADE inhibe edici peptitler, ortak kültür fermantasyonu yoluyla da üretilebileceği literatürde bildirilmektedir.

Sonuç olarak, çalışma kapsamında kullanılan hammadde, ADE aktivitesinin belirlenmesi sırasında kullanılan enzim ve optimum çalışma koşulları değerlendirildiğinde uygun maliyetli ve katma değeri yüksek ürün eldesinin sağlanabileceği yorumu yapılabilmektedir.



## KAYNAKLAR

- Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., & Danquah, M. K.** (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioprocess Processing*, 98, 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.02.003>
- Ahmed, A. S., El-Bassiony, T., Elmalt, L. M., & Ibrahim, H. R.** (2015). Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International*, 74, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.032>
- Aissaoui, N., Abidi, F., Hardouin, J., Abdelkafi, Z., Marrakchi, N., Jouenne, T., & Marzouki, M. N.** (2017). ACE Inhibitory and Antioxidant Activities of Novel Peptides from *Scorpaena notata* By-product Protein Hydrolysate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 23(1), 13–23. <https://doi.org/10.1007/s10989-016-9536-6>
- Aluko, R. E.** (2015). Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. *Current Opinion in Food Science*, 4, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.05.002>
- Aluko, R. E.** (2019). Food protein-derived renin-inhibitory peptides: in vitro and in vivo properties. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12648>
- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A.** (2016). Physical and flow properties of rice protein powders. *Journal of Food Engineering*, 190, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.05.022>
- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A.** (2017). The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 64, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.008>
- Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. S., & Shahidi, F.** (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*, 18, 1125–1137. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.021>
- Arnold, U., Rücknagel, K. P., Schierhorn, A., & Ulbrich-Hofmann, R.** (1996). Thermal unfolding and proteolytic susceptibility of ribonuclease A. *European Journal of Biochemistry*, 237(3), 862–869. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0862p.x>

- Arshad, N., Siow, H.-L., Ngoh, Y.-Y., Sofian, N. A. H. S., & Gan, C.-Y.** (2019). *Enzyme and Bioactive Peptides—A Strategy for Discovery and Identification of Antihypertensive Peptides*. *Enzymes in Food Biotechnology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00020-7>
- Badiani, K.** (2002). Peptides as drugs. *Qjm*, 92(1), 1–4. <https://doi.org/10.1093/qjmed/92.1.1>
- Bah, C. S. F., Bekhit, A. E. D. A., Carne, A., & McConnell, M. A.** (2013). Slaughterhouse blood: An emerging source of bioactive compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), 314–331. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12013>
- Bah, C. S. F., Bekhit, A. E. D. A., McConnell, M. A., & Carne, A.** (2016). Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases. *Food Chemistry*, 213, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.065>
- Bao, C., Chen, H., Chen, L., Cao, J., & Meng, J.** (2016). Comparison of ACE inhibitory activity in skimmed goat and cow milk hydrolyzed by alcalase, flavourzyme, neutral protease and proteinase K. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 20(1), 77–84. <https://doi.org/10.1515/aucft-2016-0006>
- Beermann, C., Euler, M., Herzberg, J., & Stahl, B.** (2009). Anti-oxidative capacity of enzymatically released peptides from soybean protein isolate. *European Food Research and Technology*, 229(4), 637–644. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1093-1>
- Bhaskar, B., Ananthanarayan, L., & Jamdar, S.** (2019). Purification, identification, and characterization of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from alcalase digested horse gram flour. *Lwt*, 103(June 2018), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.059>
- Bhat, Z. F., Kumar, S., & Bhat, H. F.** (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5377–5392. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1731-5>
- Boschin, G., Scigliuolo, G. M., Resta, D., & Arnoldi, A.** (2014). ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry*, 145, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.076>
- Caldera, L., Franzetti, L., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., & Heyndrickx, M.** (2016). Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology*, 54, 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.004>
- Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A. J., Jiménez-Martínez, C., Gutiérrez-López, G. F., & Dávila-Ortiz, G.** (2012). Use of Proteomics and Peptidomics Methods in Food Bioactive Peptide Science and Engineering. *Food Engineering Reviews*, 4(4), 224–243. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9058-8>

- Castellano, P., Aristoy, M. C., Sentandreu, M. Á., Vignolo, G., & Toldrá, F.** (2013). Peptides with angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity generated from porcine skeletal muscle proteins by the action of meat-borne *Lactobacillus*. *Journal of Proteomics*, *89*, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.06.023>
- Charoenchai, C., Fleet, G. H., Henschke, P. A., & Todd, B. E. N.** (1997). Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *3*(1), 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x>
- Chasseriaud, L., Miot-Sertier, C., Coulon, J., Iturmendi, N., Moine, V., Albertin, W., & Bely, M.** (2015). A new method for monitoring the extracellular proteolytic activity of wine yeasts during alcoholic fermentation of grape must. *Journal of Microbiological Methods*, *119*, 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.025>
- Chaves-López, C., Serio, A., Paparella, A., Martuscelli, M., Corsetti, A., Tofalo, R., & Suzzi, G.** (2014). Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. *Food Microbiology*, *42*, 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.005>
- Chaves-López, C., Tofalo, R., Serio, A., Paparella, A., Sacchetti, G., & Suzzi, G.** (2012). Yeasts from Colombian Kumis as source of peptides with Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk. *International Journal of Food Microbiology*, *159*(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.028>
- Cheung, I. W. Y., Nakayama, S., Hsu, M. N. K., Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y.** (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates from oat (*Avena sativa*) proteins by in silico and in vitro analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(19), 9234–9242. <https://doi.org/10.1021/jf9018245>
- Chi, Z., Ma, C., Wang, P., & Li, H. F.** (2007). Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology*, *98*(3), 534–538. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.006>
- Chiang, W. D., Tsou, M. J., Tsai, Z. Y., & Tsai, T. C.** (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. *Food Chemistry*, *98*(4), 725–732. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.038>
- Ciafardini, G., Zullo, B. A., Antonielli, L., Corte, L., Roscini, L., & Cardinali, G.** (2013). *Yamadazyma terventina* sp. nov., a yeast species of the *Yamadazyma* clade from Italian olive oils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *63*(1), 372–376. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.045898-0>
- Çifçi, B.** (2014). Matriks Metalloproteinaz-2 ve Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim için Peptit İnhibitörleri Sentezi, (September), 561–565.
- Clare, D. A., & Swaisgood, H. E.** (2000). Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *Journal of Dairy Science*, *83*(6), 1187–1195. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(00\)74983-6](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(00)74983-6)

- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M.** (2011). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(5), 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Contreras, M. del M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., & Recio, I.** (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19(10), 566–573. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.05.004>
- Coppey, L., Davidson, E., Rinehart, T., Gellett, J., Oltman, C., Lund, D., & Yorek, M.** (2006). ACE inhibitor or angiotensin II receptor antagonist attenuates diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 55(2), 341–348. Tarihinde adresinden erişildi <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,shib&db=jlh&AN=106449596&site=ehost-live>
- Coscuela, E. R., Amorim, M. M., Voss, G. B., Nerli, B. B., Picó, G. A., & Pintado, M. E.** (2016). Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis. *Food Chemistry*, 198, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.068>
- Dadshahi, Z., Homaei, A., Zeinali, F., Sajedi, R. H., & Khajeh, K.** (2016). Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes *Litopenaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. *Food Chemistry*, 202, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.104>
- Daskaya-Dikmen, C., Yucetepe, A., Karbancioglu-Guler, F., Daskaya, H., & Ozelik, B.** (2017). Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides from Plants. *Nutrients*, 9(4), 316. <https://doi.org/10.3390/nu9040316>
- De Gobba, C., Tompa, G., & Otte, J.** (2014). Bioactive peptides from caseins released by cold active proteolytic enzymes from *Arsukibacterium ikkense*. *Food Chemistry*, 165, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.082>
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M.** (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296–1307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.004>
- Daskaya-Dikmen, C.** (2018). Soğukta Aktif Enzim Üretimi ve Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü Biyoaktif Peptit Eldesinde Kullanılması. *Director*, 15(2), 2017–2019. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2004.3.66178>
- Erdmann, K., Cheung, B. W. Y., & Schröder, H.** (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(10), 643–654. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.010>

- Espejo-Carpio, F. J., De Gobba, C., Guadix, A., Guadix, E. M., & Otte, J.** (2013). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. *International Dairy Journal*, 32(2), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.04.002>
- Fernández, M., Úbeda, J. F., & Briones, A. I.** (2000). Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *International Journal of Food Microbiology*, 59(1–2), 29–36. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00283-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00283-X)
- Fernández, Margarita, Benito, M. J., Martín, A., Casquete, R., Córdoba, J. J., & Córdoba, M. G.** (2016). Influence of starter culture and a protease on the generation of ACE-inhibitory and antioxidant bioactive nitrogen compounds in Iberian dry-fermented sausage “salchichón”. *Heliyon*, 2(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00093>
- Fitzgerald, R. J., & Meisel, H.** (2003). Milk Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides. *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, 675–698. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_20)
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J.** (2004). Hypotensive Peptides from Milk Proteins. *Journal of Nutrition*, 134(4), 974–979. <https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1691>
- FitzGerald, R. J., & Norris, R.** (2013). Antihypertensive Peptides from Food Proteins, (2016), 267–322.
- Fotedar, R., & Al-Hedaithy, S.** (2005). Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*, 62–67.
- Galán-Ladero, M. A., Blanco, M. T., Sacristán, B., Fernández-Calderón, M. C., Pérez-Giraldo, C., & Gómez-García, A. C.** (2010). Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. *Medical Mycology*, 48(1), 207–210. <https://doi.org/10.3109/13693780902801242>
- García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., Gomez, R., & Martinez-Villaluenga, C.** (2015). High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin i converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chemistry*, 171, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.116>
- García-Tejedor, A., Sánchez-Rivera, L., Recio, I., Salom, J. B., & Manzanares, P.** (2015). Dairy *Debaryomyces hansenii* strains produce the antihypertensive casein-derived peptides LHLPLP and HLPLP. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2), 550–556. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.019>
- García Fillería, S. F., & Tironi, V. A.** (2017). Prevention of in vitro oxidation of low density lipoproteins (LDL) by amaranth peptides released by gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 34, 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.032>

- García, M. C., Endermann, J., González-García, E., & Marina, M. L.** (2015). HPLC-Q-TOF-MS Identification of Antioxidant and Antihypertensive Peptides Recovered from Cherry (*Prunus cerasus* L.) Subproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(5), 1514–1520. <https://doi.org/10.1021/jf505037p>
- Gu, Y., & Wu, J.** (2013). LC-MS/MS coupled with QSAR modeling in characterising of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean proteins. *Food Chemistry*, *141*(3), 2682–2690. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.064>
- Guang, C., & Phillips, R. D.** (2009). Plant food-derived angiotensin i converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(12), 5113–5120. <https://doi.org/10.1021/jf900494d>
- Han, S. J., Park, H., Kim, S., Kim, D., Park, H. J., & Yim, J. H.** (2016). Enhanced production of protease by *Pseudoalteromonas arctica* PAMC 21717 via statistical optimization of mineral components and fed-batch fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *46*(4), 328–335. <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1031390>
- Hanafi, M. A., Hashim, S. N., Chay, S. Y., Ebrahimpour, A., Zarei, M., Muhammad, K., ... Saari, N.** (2018). High angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Alcalase-digested green soybean (*Glycine max*) hydrolysates. *Food Research International*, *106*(January), 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.030>
- Hang, M., & Zhao, X. H.** (2012). Fermentation time and ethanol/water-based solvent system impacted in vitro ACE-inhibitory activity of the extract of Mao-tofu fermented by *Mucor* spp. *CYTA - Journal of Food*, *10*(2), 137–143. <https://doi.org/10.1080/19476337.2011.601428>
- Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J.** (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, *4*(1), 6–24. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.09.001>
- Hartmann, R., & Meisel, H.** (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, *18*(2), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013>
- Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P.** (2007). Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. *Biotechnology Journal*, *2*(4), 435–449. <https://doi.org/10.1002/biot.200700045>
- He, H. L., Liu, D., & Ma, C. B.** (2013). Review on the Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor Peptides from Marine Proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *169*(3), 738–749. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0024-y>
- He, R., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Ju, X., & Aluko, R. E.** (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods*, *5*(1), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.008>

- Hernández-Ledesma, B., Del Mar Contreras, M., & Recio, I.** (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, *165*(1), 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.11.001>
- Himaya, S. W. A., Ngo, D. H., Ryu, B., & Kim, S. K.** (2012). An active peptide purified from gastrointestinal enzyme hydrolysate of Pacific cod skin gelatin attenuates angiotensin-1 converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress. *Food Chemistry*, *132*(4), 1872–1882. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.020>
- Hoogenkamp, H., Kumagai, H., & Wanasundara, J. P. D.** (2016). *Rice Protein and Rice Protein Products. Sustainable Protein Sources*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00003-2>
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., & Darewicz, M.** (2014). Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(2), 114–134. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12051>
- Jakubczyk, A., Karaś, M., Baraniak, B., & Pietrzak, M.** (2013). The impact of fermentation and in vitro digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chemistry*, *141*(4), 3774–3780. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.095>
- Jang, J. H., Jeong, S. C., Kim, J. H., Lee, Y. H., Ju, Y. C., & Lee, J. S.** (2011). Characterisation of a new antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Pleurotus cornucopiae*. *Food Chemistry*, *127*(2), 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.010>
- Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L., & He, R.** (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, *119*(1), 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.036>
- Jin, D. X., Liu, X. L., Zheng, X. Q., Wang, X. J., & He, J. F.** (2016). Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chemistry*, *204*, 427–436. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.119>
- Joshi, S., & Satyanarayana, T.** (2013). Biotechnology of Cold-Active Proteases. *Biology*, *2*(2), 755–783. <https://doi.org/10.3390/biology2020755>
- Jung, T.-H., Yun, S.-S., Lee, W.-J., Kim, J.-W., Ha, H.-K., Yoo, M., ... Han, K.-S.** (2016). Hydrolysis by Alcalase Improves Hypoallergenic Properties of Goat Milk Protein. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *36*(4), 516–522. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.4.516>
- Kantarcioğlu, A. S., & Yücel, A.** (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains Phospholipase- and Protease-Aktivitat bei klinischen - mme *Candida* - Isolaten mit Bezug zur Herkunft der Sta, *165*, 160–165.

- Kilara, A., & Panyam, D.** (2003). Peptides From Milk Proteins and Their Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(6), 607–633. <https://doi.org/10.1080/10408690390251138>
- Kim, M., Si, J. B., Reddy, L. V., & Wee, Y. J.** (2016). Enhanced production of extracellular proteolytic enzyme excreted by a newly isolated: *Bacillus subtilis* FBL-1 through combined utilization of statistical designs and response surface methodology. *RSC Advances*, 6(56), 51270–51278. <https://doi.org/10.1039/c6ra07724b>
- Kim, S. K., & Wijesekara, I.** (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003>
- Kim, W.-S., Kim, P.-H., & Shimazaki, K.** (2016). Sensitivity of *Pseudomonas syringae* to Bovine Lactoferrin Hydrolysates and Identification of a Novel Inhibitory Peptide. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(4), 487–493. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.4.487>
- Kobayashi, Y., Yamauchi, T., Katsuda, T., Yamaji, H., & Katoh, S.** (2008). Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory mechanism of tripeptides containing aromatic residues. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(3), 310–312. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.310>
- Koga-Ito, C. Y., Lyon, J. P., Vidotto, V., & De Resende, M. A.** (2006). Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia*, 161(4), 219–223. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0001-x>
- Kong, X., Guo, M., Hua, Y., Cao, D., & Zhang, C.** (2008). Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. *Bioresource Technology*, 99(18), 8873–8879. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.056>
- Korhonen, H., & Pihlanto, A.** (2007). Technological Options for the Production of Health-Promoting Proteins and Peptides Derived from Milk and Colostrum. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 829–843.
- Korhonen, Hannu, & Pihlanto, A.** (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945–960. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>
- Kuba, M., Tanaka, K., Sesoko, M., Inoue, F., & Yasuda, M.** (2009). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in red-mold rice made by *Monascus purpureus*. *Process Biochemistry*, 44(10), 1139–1143. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.007>
- Lafarga, T., & Hayes, M.** (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products: Generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science*, 98(2), 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.036>



- Lam, L. H., Shimamura, T., Sakaguchi, K., Noguchi, K., Ishiyama, M., Fujimura, Y., & Ukeda, H.** (2007). Assay of angiotensin I-converting enzyme-inhibiting activity based on the detection of 3-hydroxybutyric acid. *Analytical Biochemistry*, *364*(2), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.02.017>
- Lee, B. H., Lai, Y. S., & Wu, S. C.** (2015). Antioxidation, angiotensin converting enzyme inhibition activity, nattokinase, and antihypertension of *Bacillus subtilis* (natto)-fermented pigeon pea. *Journal of Food and Drug Analysis*, *23*(4), 750–757. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.06.008>
- Lee, S. Y., & Hur, S. J.** (2017). Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, *228*, 506–517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.039>
- Li-Chan, E. C. Y.** (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: Research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, *1*(1), 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.09.005>
- Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B., & Wu, Y.** (2007). Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, *102*(4), 1135–1143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.002>
- Li, G. H., Liu, H., Shi, Y. H., & Le, G. W.** (2005). Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *37*(2), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.11.004>
- Lin, J., Hua, B., Xu, Z., Li, S., & Ma, C.** (2016). The Impact of Proteolytic Pork Hydrolysate on Microbial, Flavor and Free Amino Acids Compounds of Yogurt. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *36*(4), 558–565. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.4.558>
- Liu, M., Du, M., Wang, C., Song, W., Jiang, L., & Du, M.** (2013). Purification and identification of an ACE-inhibitory peptide from walnut protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*, *239*(2), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2227-7>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.004>
- Lourenço da Costa, E., Antonio da Rocha Gontijo, J., & Netto, F. M.** (2007). Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, *17*(6), 632–640. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.003>

- Majumder, K., & Wu, J.** (2010). A new approach for identification of novel antihypertensive peptides from egg proteins by QSAR and bioinformatics. *Food Research International*, 43(5), 1371–1378. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.027>
- Mäkinen, S., Streng, T., Larsen, L. B., Laine, A., & Pihlanto, A.** (2016). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antihypertensive properties of potato and rapeseed protein-derived peptides. *Journal of Functional Foods*, 25, 160–173. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.05.016>
- Mao, X. Y., Cheng, X., Wang, X., & Wu, S. J.** (2011). Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 126(2), 484–490. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.025>
- Martínez-Medina, G. A., Barragán, A. P., Ruiz, H. A., Ilyina, A., Martínez Hernández, J. L., Rodríguez-Jasso, R. M., ... Aguilar-González, C. N.** (2018). *Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry. Enzymes in Food Biotechnology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813280-7.00014-1>
- Martínez-Medina, G. A., Barragán, A. P., Ruiz, H. A., Ilyina, A., Martínez Hernández, J. L., Rodríguez-Jasso, R. M., ... Aguilar-González, C. N.** (2019). *Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry. Enzymes in Food Biotechnology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00014-1>
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. del M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F., & Vioque, J.** (2009). Sunflower protein hydrolysates reduce cholesterol micellar solubility. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(2), 86–93. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0108-1>
- Meisel, H.** (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 8(5–6), 363–373. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00059-4)
- Meisel, H.** (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *BioFactors*, 21(1–4), 55–61. <https://doi.org/10.1002/biof.552210111>
- Moayedi, A., Mora, L., Aristoy, M. C., Hashemi, M., Safari, M., & Toldrá, F.** (2016). ACE-Inhibitory and Antioxidant Activities of Peptide Fragments Obtained from Tomato Processing By-Products Fermented Using *Bacillus subtilis*: Effect of Amino Acid Composition and Peptides Molecular Mass Distribution. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(1), 48–6. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2198-1>
- Mohan, A., McClements, D. J., & Udenigwe, C. C.** (2016). Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight. *Food Chemistry*, 213, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.075>
- Mora, L., Reig, M., & Toldrá, F.** (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, 65(PC), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.014>

- Moronta, J., Smaldini, P. L., Docena, G. H., & Añón, M. C.** (2016). Peptides of amaranth were targeted as containing sequences with potential anti-inflammatory properties. *Journal of Functional Foods*, *21*, 463–473. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.022>
- Moskowitz, D. W.** (2002). David w. moskowitz, m.d., m.a., f.a.c.p., *4*(6).
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.10.015>
- Mothe, T., & Sultanpuram, V. R.** (2016). Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinilyticus*. *3 Biotech*, *6*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0377-y>
- Natesh, R., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D., & Acharya, R. K.** (2003). Crystal structure of the human enzyme – lisinopril complex. *Nature*, *421*(1995), 1427–1429. <https://doi.org/10.1038/nature01370>
- Nejati, F., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Diviccaro, A., Minervini, F., & Gobetti, M.** (2013). Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)-inhibitory peptides and  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA). *LWT - Food Science and Technology*, *51*(1), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.017>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M.** (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, *70*(3), 461–477. <https://doi.org/10.1021/np068054v>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M.** (2012). Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years. *Journal of Natural Products*, *75*(3), 311–335. <https://doi.org/10.1021/np200906s.Natural>
- Ni, H., Li, L., Liu, G., & Hu, S. Q.** (2012). Inhibition mechanism and model of an angiotensin i-converting enzyme (ACE)-inhibitory hexapeptide from yeast (*saccharomyces cerevisiae*). *PLoS ONE*, *7*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037077>
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J.** (2015). The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. *Journal of Functional Foods*, *17*, 640–656. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.021>
- Nooshkam, M., & Madadlou, A.** (2016). Maillard conjugation of lactulose with potentially bioactive peptides. *Food Chemistry*, *192*, 831–836. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.094>
- Organization, W. H.** (2014). WHO | Noncommunicable diseases country profiles 2014. *Who*.

- Orona-Tamayo, D., & Paredes-López, O.** (2016). Amaranth Part 1-Sustainable Crop for the 21st Century: Food Properties and Nutraceuticals for Improving Human Health. *Sustainable Protein Sources*, 239–256. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00015-9>
- Otağ, F. B., & Hayta, M.** (2016). Effects of ultrasound, microwave, fermentation and heat treatments on angiotensin-I converting enzyme activity of chickpea bioactive peptides. *The Journal of FOOD*, 41(1), 9–14. <https://doi.org/10.15237/gida.GD15030>
- Paliyath, G., & Jackson, C. J. C.** (2011). Functional Foods And Nutraceuticals. *Functional Foods, Nutraceuticals, and Degenerative Disease Prevention*, 11–43. <https://doi.org/10.1002/9780470960844.ch2>
- Pechanova, O., Takáč, T., Šamaj, J., & Pechan, T.** (2013). Maize proteomics: An insight into the biology of an important cereal crop. *Proteomics*, 13(3–4), 637–662. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200275>
- Pfeiffer, N.** (2003). Disposal and re-utilisation of fish and fish processing waste (including Aquaculture Wastes), 2–135.
- Pihlanto-Leppälä, A.** (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 11(9–10), 347–356. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00003-6)
- Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. J.** (2008). ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Chemistry*, 109(1), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.023>
- Popović, L., Peričin, D., Vaštag, Ž., Popović, S., Krimer, V., & Torbica, A.** (2013). Antioxidative and functional properties of pumpkin oil cake globulin hydrolysates. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(8), 1157–1165. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2257-5>
- Priyanto, A. D., Doerksen, R. J., Chang, C. I., Sung, W. C., Widjanarko, S. B., Kusnadi, J., ... Hsu, J. L.** (2015). Screening, discovery, and characterization of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from proteolytic hydrolysate of bitter melon seed proteins. *Journal of Proteomics*, 128, 424–435. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.018>
- Qu, W., Ma, H., Jia, J., He, R., Luo, L., & Pan, Z.** (2012). Enzymolysis kinetics and activities of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein prepared with SFP ultrasound-assisted processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(5), 1021–1026. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.02.006>
- Qu, W., Ma, H., Zhao, W., & Pan, Z.** (2013). ACE-inhibitory peptides production from defatted wheat germ protein by continuous coupling of enzymatic hydrolysis and membrane separation: Modeling and experimental studies. *Chemical Engineering Journal*, 226, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.030>

- Ramachandran, S., Singh, S. K., Larroche, C., Soccol, C. R., & Pandey, A.** (2007). Oil cakes and their biotechnological applications - A review. *Bioresource Technology*, 98(10), 2000–2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.002>
- Rayaprolu, S., Hettiarachchy, N., Horax, R., Satchithanandam, E., Chen, P., & Mauromoustakos, A.** (2015). Amino Acid Profiles of 44 Soybean Lines and ACE-I Inhibitory Activities of Peptide Fractions from Selected Lines. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(7), 1023–1033. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2655-y>
- Reid, V. J., Theron, L. W., Toit, M. Du, & Divol, B.** (2012). Identification and partial characterization of extracellular aspartic protease genes from *Metschnikowia pulcherrima* IWBT Y1123 and *Candida apicola* IWBT Y1384. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19), 6838–6849. <https://doi.org/10.1128/AEM.00505-12>
- Rizzello, C. G., Cassone, A., Di Cagno, R., & Gobbetti, M.** (2008). Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) during sourdough fermentation by selected lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 6936–6943. <https://doi.org/10.1021/jf800512u>
- Ruiz, J. A. G., Ramos, M., & Recio, I.** (2004). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 14(12), 1075–1080. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.007>
- Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C.** (2011). Bioactive peptides from muscle sources: Meat and fish. *Nutrients*, 3(9), 765–791. <https://doi.org/10.3390/nu3090765>
- Saadi, S., Saari, N., Anwar, F., Abdul Hamid, A., & Ghazali, H. M.** (2015). Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology Advances*, 33(1), 80–116. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.003>
- Sabbione, A. C., Scilingo, A., & Añón, M. C.** (2015). Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.015>
- Saiga, A., Okumura, T., Makihara, T., Katsuta, S., Shimizu, T., Yamada, R., & Nishimura, T.** (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1741–1745. <https://doi.org/10.1021/jf020604h>
- Saito, Y., Wanezaki (Nakamura), K., Kawato, A., & Imayasu, S.** (1994). Structure and Activity of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Sake and Sake Lees. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(10), 1767–1771. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.1767>

- Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y.** (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229–254. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006>
- Sayari, N., Sila, A., Haddar, A., Balti, R., Ellouz-Chaabouni, S., & Bougatef, A.** (2016). Valorisation of smooth hound (*Mustelus mustelus*) waste biomass through recovery of functional, antioxidative and antihypertensive bioactive peptides. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(1), 366–376. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5244-6>
- Schanbacher, F. L., Talhouk, R. S., Murray, F. A., Gherman, L. I., & Willett, L. B.** (1998). Milk-borne bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 8(5–6), 393–403. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00062-4)
- Sharma, K. M., Kumar, R., Panwar, S., & Kumar, A.** (2017). Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.001>
- Shimizu, M.** (2004). Food-derived peptides and intestinal functions. *BioFactors*, 21(1–4), 43–47. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L40921824>
- Shu, G., Yang, H., Chen, H., Zhang, Q., & Tian, Y.** (2015). Effect of incubation time, inoculum size, temperature, pasteurization time, goat milk powder and whey powder on ace inhibitory activity in fermented milk by *L. Plantarum* LP69. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 14(2), 107–116. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2015.2.12>
- Silva, S. V., & Malcata, F. X.** (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.009>
- Sornwatana, T., Bangphoomi, K., Roytrakul, S., Wetprasit, N., Choowongkamon, K., & Ratanapo, S.** (2015). Chebulin: Terminalia chebula Retz. fruit-derived peptide with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62(6), 746–753. <https://doi.org/10.1002/bab.1321>
- Tan, Y. E. N. N. E. E., Ayob, M. K., & Matthews, K. R.** (2013). Tryptic-Hydrolyzed Palm Kernel Cake Proteins of Different Degrees of Hydrolysis. *Journal of Food Quality*, 36, 447–456.
- Thewissen, B. G., Pauly, A., Celus, I., Brijs, K., & Delcour, J. A.** (2011). Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by wheat gliadin hydrolysates. *Food Chemistry*, 127(4), 1653–1658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.171>
- Thrane, M., Paulsen, P. V., Orcutt, M. W., & Krieger, T. M.** (2016). *Soy Protein: Impacts, Production, and Applications. Sustainable Protein Sources.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00002-0>

- Tolan, M.** (2015). *Mikrobiyal Kökenli Proteaz Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Gaziosmanpaşa Üniversitesi.* <https://doi.org/10.1016/j.ssci.2015.04.023>
- Toopcham, T., Mes, J. J., Wichers, H. J., Roytrakul, S., & Yongsawatdigul, J.** (2017). Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 proteinases hydrolyzed tilapia muscle proteins. *Food Chemistry*, 220, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.183>
- Trofa, D., Attila, G., & Nosanchuk, J. D.** (2008). *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen, 21(4), 606–625. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08>
- Tulbek, M. C., Lam, R. S. H., Wang, Y. C., Asavajaru, P., & Lam, A.** (2016). *Pea: A Sustainable Vegetable Protein Crop. Sustainable Protein Sources.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00009-3>
- Turner, A. J., & Hooper, N. M.** (2002). The angiotensin-converting enzyme gene family: Genomics and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(4), 177–183. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01994-5](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01994-5)
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E.** (2012). Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>
- Udenigwe, C. C., & Howard, A.** (2013). Meat proteome as source of functional biopeptides. *Food Research International*, 54(1), 1021–1032. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.002>
- Uhlig, T., Kyprianou, T., Martinelli, F. G., Oppici, C. A., Heiligers, D., Hills, D., ... Verhaert, P.** (2014). The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EuPA Open Proteomics*, 4, 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.05.003>
- Vaclavik, V. A., & Christian, E. W.** (2008). General Structure of Amino Acids, 145–159. Tarihinde adresinden erişildi [https://link-springer-com.libproxy1.nus.edu.sg/content/pdf/10.1007%2F978-0-387-69940-0\\_8.pdf](https://link-springer-com.libproxy1.nus.edu.sg/content/pdf/10.1007%2F978-0-387-69940-0_8.pdf)
- Van der Ven, C., Gruppen, H., De Bont, D. B. A., & Voragen, A. G. J.** (2002). Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *International Dairy Journal*, 12(10), 813–820. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00077-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00077-8)
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Decroos, K., Van Wijmelbeke, L., & Verstraete, W.** (2003). The Impact of Fermentation and In Vitro Digestion on the Formation of Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Activity from Pea and Whey Protein. *Journal of Dairy Science*, 86(2), 429–438. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(03\)73621-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(03)73621-2)

- Wang, C., Tu, M., Wu, D., Chen, H., Chen, C., Wang, Z., & Jiang, L.** (2018). Identification of an ACE-inhibitory peptide from walnut protein and its evaluation of the inhibitory mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19041156>
- Wang, D., Wang, L. jun, Zhu, F. xue, Zhu, J. ye, Chen, X. D., Zou, L., ... Li, L. te.** (2008). In vitro and in vivo studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). *Food Chemistry*, *107*(4), 1421–1428. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.072>
- Wang, Qiangqiang, Huang, Y., Qin, C., Liang, M., Mao, X., Li, S., ... Huang, Z.** (2016). Bioactive Peptides from Angelica sinensis Protein Hydrolyzate Delay Senescence in Caenorhabditis elegans through Antioxidant Activities. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/8956981>
- Wang, Quanfu, Hou, Y., Xu, Z., Miao, J., & Li, G.** (2008). Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium Colwellia sp. NJ341 with response surface methodology. *Bioresource Technology*, *99*(6), 1926–1931. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.028>
- Wang, W., Shen, S., Feng, F., He, G., & Wang, Z.** (2008). Pharmacophore-based structure optimization of angiotensin converting enzyme inhibitory peptide. *Science in China, Series B: Chemistry*, *51*(8), 786–793. <https://doi.org/10.1007/s11426-008-0085-5>
- Wang, X., Chen, H., Fu, X., Li, S., & Wei, J.** (2017). A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study. *LWT - Food Science and Technology*, *75*, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.047>
- Wang, Y., Chen, H., Wang, J., & Xing, L.** (2014). Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate-chitosan beads. *Process Biochemistry*, *49*(10), 1682–1690. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.002>
- Wu, J., Aluko, R. E., & Nakai, S.** (2006). Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship modeling of peptides containing 4-10 amino acid residues. *QSAR and Combinatorial Science*, *25*(10), 873–880. <https://doi.org/10.1002/qsar.200630005>
- Yadav, A. N., Sachan, S. G., Verma, P., Kaushik, R., & Saxena, A. K.** (2016). Cold active hydrolytic enzymes production by psychrotrophic Bacilli isolated from three sub-glacial lakes of NW Indian Himalayas. *Journal of Basic Microbiology*, *56*(3), 294–307. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500230>
- Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y.** (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, *33*(6), 756–774. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>



- Yamamoto, T., Nohara, K., Uchida, K., & Yamaguchi, H.** (1992). Purification and Characterization of Secretory Proteinase of *Candida albicans*, 36(6), 637–641.
- Yoshii, H., Tachi, N., Ohba, R., Sakamura, O., Takeyama, H., & Itani, T.** (2001). Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 128(1), 27–33. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(00\)00172-1](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(00)00172-1)
- Zarei, M., Forghani, B., Ebrahimpour, A., Abdul-Hamid, A., Anwar, F., & Saari, N.** (2015). In vitro and in vivo antihypertensive activity of palm kernel cake protein hydrolysates: Sequencing and characterization of potent bioactive. *Industrial Crops and Products*, 76, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.040>





## **EKLER**

### **EK A: ANOVA tabloları**



**Çizelge A.1 :** *Cystofilobasidium* spp. B015-1 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,003	0,003	0,478	0,527
Hata	4	0,027	0,007		
Toplam	5	0,031			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.2 :** *Cystofilobasidium* spp. B015-1 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,105	0,053	16,041	0,004
Hata	6	0,020	0,003		
Toplam	8	0,125			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.3 :** *Cystofilobasidium* spp. B015-1 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,109	0,055	16,569	0,004
Hata	6	0,020	0,003		
Toplam	8	0,129			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.4 :** *Hanseniaspora* spp. SU-35 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,010	0,005	1,950	0,223
Hata	6	0,015	0,002		
Toplam	8	0,024			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.5 :** *Hanseniaspora* spp. SU-35 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,003	0,001	0,437	0,665
Hata	6	0,020	0,003		
Toplam	8	0,023			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.6 :** *Hanseniaspora* spp. SU-35 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,017	0,009	2,570	0,156
Hata	6	0,020	0,003		
Toplam	8	0,038			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.7 :** *Hanseniaspora* spp. SU-34 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,008	0,008	2,864	0,166
Hata	4	0,011	0,003		
Toplam	5	0,019			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.8 :** *Hanseniaspora* spp. SU-34 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,154	0,077	1,352	0,328
Hata	6	0,341	0,057		
Toplam	8	0,495			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.9 :** *Hanseniaspora* spp. SU-34 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,151	0,076	3,082	0,120
Hata	6	0,147	0,025		
Toplam	8	0,299			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.10 :** *Hanseniaspora* spp. SE-42 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,208	0,104	25,939	0,001
Hata	6	0,024	0,004		
Toplam	8	0,232			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.11 :** *Hanseniaspora* spp. SE-42 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,089	0,045	2,950	0,128
Hata	6	0,091	0,015		
Toplam	8	0,180			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.12 :** *Hanseniaspora* spp. SE-42 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,051	0,026	1,896	0,230
Hata	6	0,081	0,014		
Toplam	8	0,132			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.13 :** *Hanseniaspora* spp. SK-14 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,227	0,114	23,565	0,001
Hata	6	0,029	0,005		
Toplam	8	0,256			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.14 :** *Hanseniaspora* spp. SK-14 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,045	0,023	6,836	0,028
Hata	6	0,020	0,003		
Toplam	8	0,065			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.15 :** *Hanseniaspora* spp. SK-14 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,076	0,038	8,455	0,018
Hata	6	0,027	0,005		
Toplam	8	0,104			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.16 :** *Hanseniaspora* spp. SKI-38 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,005	0,003	0,581	0,588
Hata	6	0,026	0,004		
Toplam	8	0,031			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.17 :** *Hanseniaspora* spp. SKI-38 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,112	0,056	6,081	0,036
Hata	6	0,055	0,009		
Toplam	8	0,167			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.18 :** *Hanseniaspora* spp. SKI-38 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,176	0,088	12,210	0,008
Hata	6	0,043	0,007		
Toplam	8	0,219			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.19 :** *Metschnikowia* spp. SU-4 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,101	0,101	30,250	0,032
Hata	2	0,007	0,003		
Toplam	3	0,108			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.20 :** *Metschnikowia* spp. SU-4 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,043	0,021	1,447	0,337
Hata	4	0,059	0,015		
Toplam	6	0,102			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.21 :** *Metschnikowia* spp. SK-21 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,149	0,074	20,399	0,002
Hata	6	0,022	0,004		
Toplam	8	0,171			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.22 :** *Metschnikowia* spp. SK-21 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,147	0,074	43,914	0,000
Hata	6	0,010	0,002		
Toplam	8	0,157			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.23 :** *Metschnikowia* spp. SK-21 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,085	0,043	7,709	0,022
Hata	6	0,033	0,006		
Toplam	8	0,119			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.24 :** *Metschnikowia* spp. SK-12 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,190	0,095	23,655	0,001
Hata	6	0,024	0,004		
Toplam	8	0,214			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.25 :** *Metschnikowia* spp. SK-12 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,258	0,129	15,505	0,004
Hata	6	0,050	0,008		
Toplam	8	0,308			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C



**Çizelge A.26 :** *Metschnikowia* spp. SK-12 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,080	0,040	3,612	0,093
Hata	6	0,066	0,011		
Toplam	8	0,146			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.27 :** *Metschnikowia* spp. SK-20 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,074	0,037	3,499	0,098
Hata	6	0,063	0,011		
Toplam	8	0,137			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.28 :** *Metschnikowia* spp. SK-20 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,108	0,054	5,183	0,049
Hata	6	0,063	0,010		
Toplam	8	0,171			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.29 :** *Metschnikowia* spp. SK-20 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,045	0,023	0,962	0,434
Hata	6	0,141	0,023		
Toplam	8	0,186			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.30 :** *Pichia* spp. SBY-7 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,112	0,056	33,424	0,001
Hata	6	0,010	0,002		
Toplam	8	0,122			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.31 :** *Pichia* spp. SBY-7 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,225	0,112	14,275	0,005
Hata	6	0,047	0,008		
Toplam	8	0,272			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.32 :** *Rhodospiridiobolus* spp. B5-1 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,031	0,031	7,456	0,052
Hata	4	0,017	0,004		
Toplam	5	0,047			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.33 :** *Rhodospiridiobolus* spp. B5-1 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,095	0,048	24,415	0,001
Hata	6	0,012	0,002		
Toplam	8	0,107			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.34 :** *Rhodospiridiobolus* spp. B5-1 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,054	0,027	10,762	0,010
Hata	6	0,015	0,003		
Toplam	8	0,069			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.35 :** *Rhodospiridiobolus* spp. BY-2 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,000	0,000	0,005	0,949
Hata	4	0,132	0,033		
Toplam	5	0,132			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.36 :** *Rhodosporidiobolus* spp. BY-2 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,191	0,095	17,290	0,003
Hata	6	0,033	0,006		
Toplam	8	0,224			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.37 :** *Rhodosporidiobolus* spp. BY-2 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,121	0,061	28,592	0,001
Hata	6	0,013	0,002		
Toplam	8	0,134			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.38 :** *Rhodosporidiobolus* spp. BY-9 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,079	0,079	9,756	0,035
Hata	4	0,033	0,008		
Toplam	5	0,112			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.39 :** *Rhodosporidiobolus* spp. BY-9 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,039	0,020	5,620	0,042
Hata	6	0,021	0,003		
Toplam	8	0,060			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.40 :** *Rhodosporidiobolus* spp. BY-9 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,003	0,001	0,445	0,660
Hata	6	0,020	0,003		
Toplam	8	0,023			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.41 :** *Yamadazyma* spp. B010 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,336	0,168	30,809	0,001
Hata	6	0,033	0,005		
Toplam	8	0,369			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.42 :** *Yamadazyma* spp. B010 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,278	0,139	26,844	0,002
Hata	5	0,026	0,005		
Toplam	7	0,304			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.43 :** *Yamadazyma* spp. B010 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,394	0,197	52,168	0,000
Hata	6	0,023	0,004		
Toplam	8	0,417			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.44 :** *Yamadazyma* spp. B013-2 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,403	0,201	83,179	0,000
Hata	6	0,015	0,002		
Toplam	8	0,417			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.45 :** *Yamadazyma* spp. B013-2 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,192	0,096	38,991	0,000
Hata	6	0,015	0,002		
Toplam	8	0,207			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.46 :** *Yamadazyma* spp. B013-2 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,076	0,038	19,705	0,002
Hata	6	0,012	0,002		
Toplam	8	0,087			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.47 :** *Yamadazyma* spp. B015-2 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,049	0,049	5,063	0,088
Hata	4	0,038	0,010		
Toplam	5	0,087			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.48 :** *Yamadazyma* spp. B015-2 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,000	0,000	0,004	0,955
Hata	4	0,164	0,041		
Toplam	5	0,164			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.49 :** *Yamadazyma* spp. B015-2 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,264	0,132	4,273	0,070
Hata	6	0,185	0,031		
Toplam	8	0,450			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.50 :** *Yamadazyma* spp. B04 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,150	0,150	82,798	0,001
Hata	4	0,007	0,002		
Toplam	5	0,158			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.51 :** *Yamadazyma* spp. B04 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,278	0,139	32,929	0,001
Hata	6	0,025	0,004		
Toplam	8	0,303			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.52 :** *Yamadazyma* spp. B04 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,242	0,121	92,373	0,000
Hata	6	0,008	0,001		
Toplam	8	0,250			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.53 :** *Yamadazyma* spp. B514-1 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,246	0,123	191,190	0,000
Hata	6	0,004	0,001		
Toplam	8	0,250			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.54 :** *Yamadazyma* spp. B514-1 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,133	0,066	61,557	0,000
Hata	6	0,006	0,001		
Toplam	8	0,139			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.55 :** *Yamadazyma* spp. B514-1 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,012	0,006	1,368	0,324
Hata	6	0,026	0,004		
Toplam	8	0,038			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.56 :** *Yamadazyma* spp. B514-2 izolatının 24 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,244	0,244		
Hata	2	0,000	0,000		
Toplam	3	0,244			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.57 :** *Yamadazyma* spp. B514-2 izolatının 48 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,564	0,282		
Hata	2	0,000	0,000		
Toplam	4	0,564			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.58 :** *Yamadazyma* spp. B514-2 izolatının 72 saat inkübasyon süresinde farklı sıcaklıklarda ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,680	0,340		
Hata	2	0,000	0,000		
Toplam	4	0,680			

Faktörler: Pz indeks 15°C; 25°C; 35°C

**Çizelge A.59 :** *Cystofilobasidium* spp. B015-1 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,040	0,040	60,025	0,001
Hata	4	0,003	0,001		
Toplam	5	0,043			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.60 :** *Cystofilobasidium* spp. B015-1 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,026	0,013	1,307	0,338
Hata	6	0,059	0,010		
Toplam	8	0,085			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.61 :** *Cystofilobasidium* spp. B015-1 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,065	0,033	39,568	0,000
Hata	6	0,005	0,001		
Toplam	8	0,070			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.62 :** *Hanseniaspora* spp. SU-35 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,084	0,042	47,513	0,000
Hata	6	0,005	0,001		
Toplam	8	0,090			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.63 :** *Hanseniaspora* spp. SU-35 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,060	0,030	6,408	0,032
Hata	6	0,028	0,005		
Toplam	8	0,088			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.64 :** *Hanseniaspora* spp. SU-35 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,008	0,004	1,043	0,409
Hata	6	0,022	0,004		
Toplam	8	0,030			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat



**Çizelge A.65 :** *Hanseniaspora* spp. SU-34 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,170	0,085	1,087	0,396
Hata	6	0,470	0,078		
Toplam	8	0,640			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.66 :** *Hanseniaspora* spp. SU-34 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,068	0,034	6,874	0,028
Hata	6	0,030	0,005		
Toplam	8	0,097			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.67 :** *Hanseniaspora* spp. SE-42 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,327	0,164	669,318	0,000
Hata	6	0,001	0,000		
Toplam	8	0,329			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.68 :** *Hanseniaspora* spp. SE-42 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,254	0,127	4,095	0,076
Hata	6	0,186	0,031		
Toplam	8	0,440			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.69 :** *Hanseniaspora* spp. SE-42 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,014	0,007	5,179	0,049
Hata	6	0,008	0,001		
Toplam	8	0,022			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.70 :** *Hanseniaspora* spp. SK-14 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,312	0,156	319,568	0,000
Hata	6	0,003	0,000		
Toplam	8	0,315			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.71 :** *Hanseniaspora* spp. SK-14 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,029	0,015	11,195	0,009
Hata	6	0,008	0,001		
Toplam	8	0,037			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.72 :** *Hanseniaspora* spp. SK-14 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,002	0,001	0,110	0,897
Hata	6	0,065	0,011		
Toplam	8	0,068			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.73 :** *Hanseniaspora* spp. SKI-38 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,085	0,043	63,016	0,000
Hata	6	0,004	0,001		
Toplam	8	0,089			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.74 :** *Hanseniaspora* spp. SKI-38 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,130	0,065	3,233	0,111
Hata	6	0,120	0,020		
Toplam	8	0,250			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.75 :** *Metschnikowia* spp. SU-4 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,080	0,080		
Hata	0	0,000			
Toplam	1	0,080			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.76 :** *Metschnikowia* spp. SU-4 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,001	0,000	0,126	0,884
Hata	6	0,016	0,003		
Toplam	8	0,017			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.77 :** *Metschnikowia* spp. SK-21 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,194	0,097	49,152	0,000
Hata	6	0,012	0,002		
Toplam	8	0,206			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.78 :** *Metschnikowia* spp. SB-29 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,102	0,051	93,449	0,000
Hata	6	0,003	0,001		
Toplam	8	0,105			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.79 :** *Metschnikowia* spp. SK-21 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,084	0,042	5,051	0,052
Hata	6	0,050	0,008		
Toplam	8	0,134			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.80 :** *Metschnikowia* spp. SK-12 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,151	0,075	40,653	0,000
Hata	6	0,011	0,002		
Toplam	8	0,162			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.81 :** *Metschnikowia* spp. SK-12 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,083	0,041	3,211	0,113
Hata	6	0,077	0,013		
Toplam	8	0,160			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.82 :** *Metschnikowia* spp. SK-12 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,082	0,041	4,723	0,059
Hata	6	0,052	0,009		
Toplam	8	0,134			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.83 :** *Metschnikowia* spp. SK-20 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,148	0,074	34,289	0,001
Hata	6	0,013	0,002		
Toplam	8	0,161			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.84 :** *Metschnikowia* spp. SK-20 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,197	0,099	10,194	0,012
Hata	6	0,058	0,010		
Toplam	8	0,255			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.85 :** *Metschnikowia* spp. SK-20 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,072	0,036	1,111	0,389
Hata	6	0,196	0,033		
Toplam	8	0,268			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.86 :** *Pichia* spp. SBY-7 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,166	0,083	19,430	0,002
Hata	6	0,026	0,004		
Toplam	8	0,191			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.87 :** *Pichia* spp. SBY-7 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,195	0,097	18,451	0,003
Hata	6	0,032	0,005		
Toplam	8	0,226			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.88 :** *Rhodospiridiobolus* spp. B5-1 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,014	0,014	3,986	0,117
Hata	4	0,014	0,004		
Toplam	5	0,028			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.89 :** *Rhodospiridiobolus* spp. B5-1 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,036	0,018	4,398	0,067
Hata	6	0,025	0,004		
Toplam	8	0,061			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.90 :** *Rhodospiridiobolus* spp. B5-1 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,004	0,002	2,824	0,137
Hata	6	0,005	0,001		
Toplam	8	0,009			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.91 :** *Rhodospiridiobolus* spp. BY-2 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,019	0,019	5,558	0,078
Hata	4	0,014	0,003		
Toplam	5	0,033			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.92 :** *Rhodospiridiobolus* spp. BY-2 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,192	0,096	3,802	0,086
Hata	6	0,152	0,025		
Toplam	8	0,344			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.93 :** *Rhodospiridiobolus* spp. BY-2 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,001	0,001	0,354	0,716
Hata	6	0,012	0,002		
Toplam	8	0,013			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.94 :** *Rhodospiridiobolus* spp. BY-9 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,012	0,012	30,375	0,005
Hata	4	0,002	0,000		
Toplam	5	0,014			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.95 :** *Rhodospiridiobolus* spp. BY-9 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,052	0,026	2,672	0,148
Hata	6	0,058	0,010		
Toplam	8	0,110			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.96 :** *Rhodospiridiobolus* spp. BY-9 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,001	0,000	0,195	0,828
Hata	6	0,013	0,002		
Toplam	8	0,014			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.97 :** *Yamadazyma* spp. B010 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,073	0,036	3,480	0,099
Hata	6	0,063	0,010		
Toplam	8	0,135			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.98 :** *Yamadazyma* spp. B010 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,003	0,001	0,459	0,652
Hata	6	0,019	0,003		
Toplam	8	0,022			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.99 :** *Yamadazyma* spp. B013-2 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,176	0,088	69,912	0,000
Hata	6	0,008	0,001		
Toplam	8	0,183			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.100 :** *Yamadazyma* spp. B013-2 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,050	0,025	5,704	0,041
Hata	6	0,026	0,004		
Toplam	8	0,076			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.101 :** *Yamadazyma* spp. B013-2 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,010	0,005	4,410	0,066
Hata	6	0,007	0,001		
Toplam	8	0,017			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.102 :** *Yamadazyma* spp. B015-2 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,165	0,083	1,749	0,252
Hata	6	0,284	0,047		
Toplam	8	0,449			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.103 :** *Yamadazyma* spp. B015-2 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,009	0,005	0,328	0,732
Hata	6	0,085	0,014		
Toplam	8	0,095			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat



**Çizelge A.104 :** *Yamadazyma* spp. B04 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,089	0,045	17,111	0,003
Hata	6	0,016	0,003		
Toplam	8	0,105			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.105 :** *Yamadazyma* spp. B04 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,038	0,019	14,922	0,005
Hata	6	0,008	0,001		
Toplam	8	0,046			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.106 :** *Yamadazyma* spp. B514-1 izolatının 15°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,150	0,075	20,116	0,002
Hata	6	0,022	0,004		
Toplam	8	0,173			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.107 :** *Yamadazyma* spp. B514-1 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,102	0,051	29,223	0,001
Hata	6	0,010	0,002		
Toplam	8	0,112			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.108 :** *Yamadazyma* spp. B514-1 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,001	0,000	0,725	0,522
Hata	6	0,003	0,001		
Toplam	8	0,004			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.109 :** *Yamadazyma* spp. B514-2 izolatının 25°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	0,008	0,008		
Hata	0	0,000			
Toplam	1	0,008			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.110 :** *Yamadazyma* spp. B514-2 izolatının 35°C inkübasyon sıcaklığında farklı sürelerde ölçülen pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	2	0,011	0,006		
Hata	0	0,000			
Toplam	2	0,011			

Faktörler: Pz indeks 24 saat; 48 saat; 72 saat

**Çizelge A.111 :** 15°C inkübasyon sıcaklığında 24 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	15	0,038	0,003	1,225*10 <sup>3</sup>	0,000
Hata	32	0,000	0,000		
Toplam	47	0,038			

Faktörler: Maya izolatları SU-35; SBY-7; B010;SK-12; SK-14; SK-18; SK-20; SK-21; SB-29; SKI-36; SKI-38; SZY-41; SE-42; B013-2; B514-1; B514-2.

**Çizelge A.112 :** 15°C inkübasyon sıcaklığında 48 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	23	1,102	0,048	45,386	0,000
Hata	48	0,051	0,001		
Toplam	71	1,153			

Faktörler: Maya izolatları SE-42; SK-14; BY9; BY2; B015-1; B013-2; 35; B04; B5-1; SK-21; SK-20; SK-12; B514-1; SU-2; SBY-7; B010; SK-16; SK-18; SB-29; SU-34; SKI-36; SKI-38; SZY-41; B514-2.

**Çizelge A.113 :** 15°C inkübasyon sıcaklığında 72 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	25	2,833	0,113	39,990	0,000
Hata	52	0,147	0,003		
Toplam	77	2,980			

Faktörler: Maya izolatları B015-2; SE-42; SK-14; B015-1; BY9; BY2; SK-21; SU-35; B013-2; SK-12; SK-20; B514-1; B5-1; B04; SKI-38; SU-4; SU-2; SBY-7; B010; SK-16; SK-18; SB-29; SU-34; SKI-36; SZY-41; B514-2.

**Çizelge A.114 :** 25°C inkübasyon sıcaklığında 24 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	23	1,500	0,065	10,780	0,000
Hata	48	0,290	0,006		
Toplam	71	1,791			

Faktörler: Maya izolatları B015-1; B013-2; SK-14; B5-1; SK-12; SK-21; SE-42; B010; BY9; BY2; B04; SU-35; SK-20; SKI-38; B514-1; SU-2; SBY-7; SK-16; SK-18; SB-29; SU-34; SKI-36; SZY-41; B015-2.

**Çizelge A.115 :** 25°C inkübasyon sıcaklığında 48 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	26	3,592	0,138	9,539	0,000
Hata	54	0,782	0,014		
Toplam	80	4,374			

Faktörler: Maya izolatları B514-2; SE-42; BY2; SK-12; B013-2; B015-1; SK-21; SK-14; B5-1; SU-4; B010; SK-20; B04; BY9; SU-34; SU-35; SKI-38; B015-2; B514-1; SBY-7; SU-2; SK-16; SK-18; SB-26; SB-29; SKI-36; SZY-41.

**Çizelge A.116 :** 25°C inkübasyon sıcaklığında 72 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	26	4,466	0,172	15,545	0,000
Hata	54	0,597	0,011		
Toplam	80	5,063			

Faktörler: Maya izolatları B514-2; SE-42; SK-21; B013-2; B015-1; SK-12; SK-14; SK-20; BY2; B5-1; B010; B04; BY9; SU-35; SKI-38; SBY-7; B015-2; B514-1; SU-34; SU-2; SU-4; SK-16; SK-18; SB-26; SB-29; SKI-36; SZY-41.

**Çizelge A.117 :** 35°C inkübasyon sıcaklığında 24 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	24	2,980	0,124	27,030	0,000
Hata	50	0,230	0,005		
Toplam	74	3,209			

Faktörler: Maya izolatları B514-2; B04; B013-2; B010; B5-1; B015-1; BY9; SE-42; B514-1; SK-14; SK-12; SK-20; BY2; SU-35; B015-2; SK-21; SU-34; SU-4; SU-2; SBY-7; SK-16; SK-18; SB-29; SKI-38; SZY-41.

**Çizelge A.118 :** 35°C inkübasyon sıcaklığında 48 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	25	3,528	0,141	47,097	0,000
Hata	52	0,156	0,003		
Toplam	77	3,684			

Faktörler: Maya izolatları B514-2; B04; B013-2; SK-12; BY9; B010; SE-42; SK-20; B5-1; B514-1; SK-14; B015-1; SBY-7; SU-34; SK-21; SU-35; B015-2; BY2; SU-4; SU-2; SK-16; SK-18; SB-29; SKI-36; SKI-38; SZY-41.

**Çizelge A.119 :** 35°C inkübasyon sıcaklığında 72 saat inkübasyon süresinde ölçülen 27 maya izolatının pz indeksleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	26	3,815	0,147	32,649	0,000
Hata	54	0,243	0,004		
Toplam	80	4,057			

Faktörler: Maya izolatları B514-2; B04; SK-12; B013-2; SE-42; B5-1; BY9; B010; SK-20; B514-1; SK-21; SBY-7; B015-1; SK-14; SU-35; B015-2; SU-34; BY2; SU-4; SU-2; SK-16; SK-18; SB-26; SB-29; SKI-36; SKI-38; SZY-41.

**Çizelge A.120 :** *Yamadazyma* spp. B013-2 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	3,7	3,7	0,06	0,813
Hata	8	496,1	62,0		
Toplam	9	499,8			

Faktörler: ADE aktivitesi 24 saat; ADE aktivitesi 48 saat

**Çizelge A.121 :** *Yamadazyma* spp. B010 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	643,6	643,6	7,04	0,029
Hata	8	731,0	91,4		
Toplam	9	1374,6			

Faktörler: ADE aktivitesi 24 saat; ADE aktivitesi 48 saat

**Çizelge A.122 :** *Yamadazyma* spp. B514-1 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	425,1	425,1	9,72	0,021
Hata	6	262,5	43,7		
Toplam	7	687,6			

Faktörler: ADE aktivitesi 24 saat; ADE aktivitesi 48 saat

**Çizelge A.123 :** *Yamadazyma* spp. B514-2 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	781,4	781,4	54,82	0,000
Hata	10	142,5	14,3		
Toplam	11	923,9			

Faktörler: ADE aktivitesi 24 saat; ADE aktivitesi 48 saat

**Çizelge A.124 :** *Cystofilobasidium* spp. B015-1 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	4,4	4,4	0,12	0,74
Hata	9	326,6	36,3		
Toplam	10	331,0			

Faktörler: ADE aktivitesi 24 saat; ADE aktivitesi 48 saat

**Çizelge A.125 :** *Rhodosporidiobolus* spp. BY9 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	344,2	344,2	11,45	0,012
Hata	7	210,5	30,1		
Toplam	8	554,6			

Faktörler: ADE aktivitesi 24 saat; ADE aktivitesi 48 saat

**Çizelge A.126 :** *Metschnikowia* spp. SU-4 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	20,3	20,3	1,25	0,306
Hata	6	97,7	16,3		
Toplam	7	118,1			

Faktörler: ADE aktivitesi 24 saat; ADE aktivitesi 48 saat

**Çizelge A.127 :** *Rhodosporidiobolus* spp. B5-1 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	352,7	352,7	24,39	0,004
Hata	5	72,3	14,5		
Toplam	6	425,0			

Faktörler: ADE aktivitesi 24 saat; ADE aktivitesi 48 saat

**Çizelge A.128 :** *Metschnikowia* spp. SK-20 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	190,0	190,0	24,18	0,002
Hata	7	55,0	7,9		
Toplam	8	245,0			

Faktörler: ADE aktivitesi 24 saat; ADE aktivitesi 48 saat

**Çizelge A.129 :** *Hanseniaspora* spp. SK-14 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	213,5	213,5	32,25	0,005
Hata	4	26,5	6,6		
Toplam	5	239,9			

Faktörler: ADE aktivitesi 24 saat; ADE aktivitesi 48 saat

**Çizelge A.130 :** *Hanseniaspora* spp. SE-42 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	116,8	116,8	19,36	0,012
Hata	4	24,1	6,0		
Toplam	5	140,9			

Faktörler: ADE aktivitesi 24 saat; ADE aktivitesi 48 saat

**Çizelge A.131** : *Yamadazyma* spp. B04 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	47,3	47,3	0,63	0,446
Hata	9	671,3	74,6		
Toplam	10	718,6			

Faktörler: ADE aktivitesi 24 saat; ADE aktivitesi 48 saat

**Çizelge A.132** : *Hanseniaspora* spp. SU-34 izolatının farklı sürelerde ölçülen ACE aktiviteleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesi.

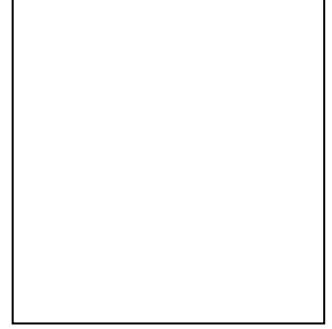
	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	P değeri
Faktörler	1	2,1	2,1	0,03	0,867
Hata	7	495,4	70,8		
Toplam	8	497,5			

Faktörler: ADE aktivitesi 24 saat; ADE aktivitesi 48 saat





## ÖZGEÇMİŞ



**Ad-Soyad** : Betül ORHAN  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 1990 - Aydın  
**E-posta** : betulorhann@gmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** :2012, Celal Bayar Üniv., Mühendislik Fak., Gıda Mühendisliği
- **Yüksek Lisans** :2019, İTÜ, Kimya Metalurji Fak., Gıda Mühendisliği

### MESLEKİ DENEYİM:

- Peda Liza Turizm ve Restaurant İşlet. Ltd. Şti. / Gıda Mühendisi – Kalite Yönetim Müdürü / İstanbul Kongre Merkezi
- İSS Catering Hazır Yemek Üretim ve Hizmet A.Ş. / Catering Hizmetleri Yönetici Yardımcısı / Vodafone Telekomünikasyon İletişim A.Ş. Projesi
- Aroma Bursa Meyve Suları ve Gıda San. A.Ş. / Staj
- AYTB Laboratuar Hizmetleri A.Ş. / Staj
- Çaçan Mühendislik ve Danışmanlık / Staj