

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORGANİK ÇÖPLERDEN ELDE EDİLEN BESİYERİNDE ÜREYEN
ASPERGİLLUS NİGER' DEN PROTEAZ ENZİMİ ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Betül TEKYILDIZ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

TEMMUZ 2023

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORGANİK ÇÖPLERDEN ELDE EDİLEN BESİYERİNDE
ÜREYEN *ASPERGİLLUS NİGER*' DEN PROTEAZ ENZİMİ
ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Betül TEKYILDIZ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Arzu ÇAĞRI MEHMETOĞLU

TEMMUZ 2023

Betül TEKYILDIZ tarafından hazırlanan “**Organik çöplerden elde edilen besiyerinde üreyen *Aspergillus niger*’ den proteaz enzimi üretimi ve karakterizasyonu**” adlı tez çalışması 12.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı: **Prof. Dr. Arzu Çağrı MEHMETOĞLU**
(Danışman)
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Doç. Dr. Ayşe AVCI**
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Doç. Dr. Emre GÜZEL**
Sakarya Üniversitesi

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “Organik çöplerden elde edilen besiyerinde üreyen *Aspergillus niger*'den proteaz enzimi üretimi ve karakterizasyonu” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

(...../...../20.....)

Betül TEKYILDIZ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tez yazımımın tüm aşamalarında değerli bilgi ve birikimlerinden yararlandığım ve yardımlarını esirgemeyen, desteğini her daim hissettiren Prof. Dr. Arzu ÇAĞRI MEHMETOĞLU'na teşekkür ederim.

Deva Holding A.Ő. ailesi olarak laboratuvar çalışmalarımnda tüm imkanlarını benimle paylaşan işyerime ve beni destekleyen yöneticilerime, vardiya arkadaşlarıma ve bu dönemde bir an olsun beni yalnız bırakmayan, çalışmamı kendi çalışması gibi benimseyen arkadaşım Süleyman CELEP'e ve yardımlarından dolayı Özge ASLAN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Son olarak ise tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü desteklerini üzerimden eksik etmeyen, her zaman varlıklarıyla bana güç veren değerli aileme teşekkürlerimi borç bilirim.

Betül TEKYILDIZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
SİMGELER	xv
TABLO LİSTESİ	xvii
ŞEKİL LİSTESİ	xix
ÖZET	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1.Enzimlerin Genel Özellikleri	1
1.2.Enzimlerin Sınıflandırılması	3
1.2.1.Mikrobiyal enzimler	4
1.2.2.Multienzimler	5
1.2.3. Termofilik enzimler	5
1.3. Proteazlar	6
1.3.1. Proteazın biyoteknolojik uygulamaları	7
1.3.2. Deri işleme endüstrisi	7
1.3.3. Atık işleme endüstrisi	7
1.3.4.Yiyecek endüstrisi	7
1.3.5. Gümüş kazanımı	8
1.3.6. Deterjan endüstrisi	8
1.3.7. Kimyasal endüstrisi	8
1.3.8. Medikal araştırmalar	8
1.4. Mikroorganizmalar	9
1.4.1. Aspergillus	9
1.4.2. Aspergillus niger	9
1.5. Enzim Saflaştırma Stratejisi	10
1.5.1. Üçlü faz ayırma sistemi (TPP)	10
1.5.3. TPP prosesini etkileyen faktörler	12
1.5.3.1.Amonyum sülfat	12
1.5.3.2. T-bütanol	13
1.5.3.3. pH	13
1.5.3.4.Sıcaklık	14
2. MATERYAL VE YÖNTEM	15
2.1. Materyal	15
2.1.1. Kullanılan organizma	15
2.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar	15
2.1.3. Çalışmada faydalanılan kimyasal maddeler	16
2.1.4. Tezde kullanılan tampon ve kimyasal çözeltiler	17
2.1.4.1.Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler	17

2.1.4.2. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler	17
2.1.4.3. Kullanılan inhibitör çözeltilerinin hazırlanışı	17
2.1.4.4. Yüzey aktif madde çözeltilerinin hazırlanışı.....	18
2.1.4.5. Substratlar ile hazırlanan çözeltiler	18
2.2. Yöntem	19
2.2.1. <i>A. niger</i> 'in çoğaltılması	19
2.2.2. Fermantasyon ortamının optimizasyonu	19
2.2.2.1. Uygun besiyeri içeriğinin belirlenmesi	19
2.2.2.2. Protein oranının proteaz enzimi üretimine etkisi	21
2.2.2.3. İnkübasyon süresinin proteaz enzimi üretimine etkisi	21
2.2.2.4. pH'nın proteaz enzimi üretimine etkisi	21
2.2.3. Proteaz enziminin üçlü faz ayırma (TPP) yöntemi kullanılarak	21
2.2.4.1. Tirozin standart eğrisinin hazırlanması	22
2.2.4.2. Protein tayini (Bradford Metodu).....	23
2.2.5. Moleküler ağırlığın belirlenmesi	24
2.2.6. Proteaz enzimiyle ilgili yapılan kinetik çalışmalar	24
2.2.6.1. Proteaz enzimi için optimum pH incelemesine yönelik çalışmalar	24
2.2.6.2. Proteaz enzimi için pH kararlılığının incelemesine yönelik çalışmalar	25
2.2.6.3. Proteaz enzimi için optimum sıcaklığın incelenmesine yönelik çalışmalar	25
2.2.6.4. Proteaz enzimi için stabil sıcaklığın incelenmesine yönelik çalışmalar	25
2.2.6.5. Proteaz aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin incelemesine yönelik çalışmalar.....	25
2.2.6.6. Proteaz aktivitesi üzerine okside edici ajanın ve yüzey aktif maddelerinin etkisinin incelenmesine yönelik çalışmalar	26
2.2.6.7. Proteaz enziminin substratlara karşı özgünlüğünün incelenmesi.....	26
3. DENEY SONUÇLARI	27
3.1. Proteaz Enziminin Üretimi	27
3.3. Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Bovine Serum Albumin Eğrisi.....	30
3.4. Proteaz Aktivitesinin Hesaplanması İçin Tirozin Standart Grafiği.....	30
3.5. Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi Kullanılarak Enzimin Saflaştırılması	31
3.5.1. TPP sistemiyle saflaştırılan proteaz enziminin amonyum sülfat ve organik çözen oranının incelenmesi.....	31
3.5.2. Proteaz enziminin TPP yöntemiyle saflaştırma sonuçları	31
3.5.3. Moleküler ağırlığın belirlenmesi	36
3.5.4. Proteaz enzimi üzerine optimum şartların incelenmesine yönelik sonuçlar.....	36
3.5.4.1. Proteaz enzimi için optimum pH tespitine dair sonuçlar	36
3.5.4.2. Proteaz enzimi üzerinde pH kararlılığının tespitine dair sonuçlar	37
3.5.4.3. Proteaz enzimi üzerine optimum sıcaklığın etkisinin tespitine yönelik sonuçlar.....	38
3.5.4.4. Proteaz enzimi üzerine stabil sıcaklığın etkisinin tespitine yönelik sonuçlar.....	39
3.5.4.5. Proteaz enziminin aktivitesi üzerine okside edici ajanının ve yüzey aktif maddelerinin etkisinin incelenmesine yönelik sonuçlar	40
3.5.4.6. İnhibitörlerin proteaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi	41
3.5.4.7. Substratların proteaz enzimi üzerindeki etkisinin incelenmesi	42
4. TARTIŞMA.....	43
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR.....	53

ÖZGEÇMİŞ.....	59
----------------------	-----------

KISALTMALAR

BSA	: Sığır Serum Albumin
DNA	:Deoksiribonükleit Asit
DNTB	:Dinitrotiyo Benzen
EDTA	:Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Mg	:Miligram
ml	:Mililitre
Dk	:Dakika
M	:Molar
mM	:Milimolar
NaOH	:Sodyum Hidroksit
HCl	:Hidroklorik Asit
Gr	:Gram
nm	:Nanometre
EU	:Enzim Ünitesi
PAGE	:Poliakrilamid Jel Elektrofezi
Rpm	:Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
Sn	:Saniye
PMSF	:Fenil Metil Sülfonil Florid
TCA	:Triklorik asit
TPP	: Three-phase partitioning
TSA	:Tyriptic Soy Agar
TSB	:Tyriptic Soy Broth

SİMGELER

°C :Santigrat Derece

B : Beta

µg : Mikrogram

µmol : Mikromol

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması ve reaksiyon mekanizmaları.....	4
Tablo 2.1. Tez çalışmasında yararlanılan alet ve cihazlar.....	15
Tablo 2.2. Tez çalışmasında faydalanılan kimyasal maddeler.....	16
Tablo 2.3. Deneyde kullanılan parametreler ve seviyeleri.....	19
Tablo 2.4. Organik çöplerin sınıflandırılması.....	20
Tablo 2.5. Besiyeri bileşenleri ve gramajları.....	20
Tablo 3.1. Proteaz enziminin oluşmasını etkileyen faktörlerin incelenmesi.....	27
Tablo 3.2. Deney tasarımı için verim.....	28
Tablo 3.3. Sinyal gürültü oranları için yanıt tablosu.....	28
Tablo 3.4. <i>A.Niger</i> 'den saflaştırılan proteazın enziminin saflaştırma tablosu.....	32
Tablo 3.5. Proteaz enzimi üzerine optimum pH değerinin tespiti için oluşturulan bağıl aktivite çizelgesi.....	36
Tablo 3.6. Proteaz enzimi üzerine pH kararlılık değerinin tespiti için oluşturulan bağıl aktivite çizelgesi.....	37
Tablo 3.7. Proteaz enzimi üzerine optimum sıcaklık tespiti için oluşturulan sıcaklık-bağıl aktivite (%) ölçüm sonuçları.....	38
Tablo 3.8. Proteaz enziminin stabil sıcaklığını tespit etmek için sıcaklık-zaman çizelgesi.....	39
Tablo 3.9. Yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	40
Tablo 3.10. İnhibisyon çözeltilerinin proteaz aktivitesi üzerine etkisi.....	42
Tablo 3.11. Substratların proteaz enzimi üzerine etkisi.....	42

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1. Deney tasarımı için ana etki grafiği.....	29
Şekil 3.2. SN oranları için ana etki grafiği.....	29
Şekil 3.3. Protein tayininde kullanılan standart grafik.....	30
Şekil 3.4. Aktivite hesaplamasında kullanılan tirozin standart grafiği.	31
Şekil 3.5. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %30 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi... 32	
Şekil 3.6. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %40 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi... 33	
Şekil 3.7. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %50 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi... 33	
Şekil 3.8. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %60 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi... 34	
Şekil 3.9. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %70 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi...34	
Şekil 3.10. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %80 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi. 35	
Şekil 3.11. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %90 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi. 35	
Şekil 3.12. Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı.	36
Şekil 3.13. Proteaz enzimi üzerine optimum pH değerinin tespiti için oluşturulan bağıl aktivite grafiği..	37
Şekil 3.14. Proteaz enzimi üzerine pH kararlılık değerinin tespiti için oluşturulan bağıl aktivite çizelgesi.	38
Şekil 3.15. Proteaz enzimi optimum sıcaklık tespiti için sıcaklık-bağıl aktivite (%) grafiği.	39
Şekil 3.16. Proteaz enzimi için stabil sıcaklık grafiği.....	40
Şekil 3.17. Saflaştırılan proteaz enzime yüzey aktif maddelerin etkisi.	41
Şekil 3.18. İnhibisyon çözeltilerinin proteaz aktivitesi üzerine etkisi	42

ORGANİK ÇÖPLERDEN ELDE EDİLEN BESİYERİNDE ÜREYEN *ASPERGİLLUS NİGER*' DEN PROTEAZ ENZİMİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Endüstriyel enzimler ile ilgili çalışmalar teknolojinin gelişmesi, kullanılan ürünlerin kullanım alanlarının artması ve ekonomik değerinin yüksek olması gibi sebeplerden kaynaklı önemlidir. Günümüz dünyasında, nüfus her geçen gün artmaktadır ve bu nedenle artan atık oluşumu gerçeğini düşünmek elzemdir çünkü oluşan atık gereksinimleri karşılanabilirse, üretim maliyetinde önemli ölçüde azalma sağlanabilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda proteazın kolay, hızlı ve düşük maliyetli şekilde üretimi için elzem parametreler optimize edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında; optimum proteaz enzimi üretmek için meyve ve sebze atığı, karbonhidrat bazlı ve protein (hayvansal veya bitkisel) oranı yüksek organik atıklarından besiyerleri hazırlanarak enzimin bu besiyerlerinde üreme potansiyelleri farklı pH (5,0, 5,5, 6,0) ve farklı inkübasyon sürelerinde (24, 48, 72 saat) Taguchi yöntemi ile araştırıldı. Taguchi yöntemiyle hesaplanan en yüksek sinyal/gürültü (S/N) oranına sahip olan seviyeler dikkate alındığında, proteaz enzim üretimi için 30 °C'de 24 saat inkübasyon süresi, pH 5,5 değeri, ve %50: 50 bitkisel ve hayvansal protein oranına sahip besiyeri şartlarının optimum şartlar olduğu belirlenmiştir. Aktiviteyi en fazla etkileyen faktörün protein oranı olduğu ve daha sonra sırasıyla inkübasyon süresi ve pH değerinin aktiviteyi etkilediği belirlendi. Inkübasyon süresinin uzaması, pH değeri ve hayvansal protein oranının artması, aktivite değerinde azalmaya sebep olduğu görüldü.

A. niger' den üretilen proteaz enzimi TPP (üçlü faz ayırma) yöntemi ile saflaştırılmış ve biyokimyasal karakterizasyonları incelenmiştir. Bu yöntem geniş bir uygulama alanına sahip, çok yönlü bir biyoayırma aracı haline gelen, yüksek geri kazanım ve saflık seviyelerine sahip bir dizi enzim ve proteini saflaştırmak için kullanılır. TPP sistemi ile proteaz enzimi 1,0:1,5 (ham enzim çözeltisi: t-bütanol oranı) ve %80 doymuş amonyum sülfat konsantrasyonu ile %235,7 verimle 13,15 kat saflaştırıldı. Enzimin alt fazda toplandığı tespit edildi ve karakterizasyon çalışmaları için alt faz kullanıldı. *A. niger*' den saflaştırılan proteaz enziminin optimum ve stabil pH'ları sırasıyla 10,0 ve 9,0; optimum ve stabil sıcaklığı ise 60°C olarak tespit edildi. Proteaz enziminin okside edici ajanlar ve yüzey aktif maddeleri varlığında gösterdiği aktivite değerleri incelendiğinde SDS' in ciddi bir aktivite kaybına sebep olduğu, diğer maddelere nazaran %1'lik H_2O_2 varlığında aktivitesini koruduğu tespit edildi. Tween 20, Tween 80 ve TrionX-100 varlığında yakın sonuçlar göstererek belli oranlarda azalmaya sebep oldu. Serin proteaz inhibitörü fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) varlığı aktiviteyi sıfıra yakın bir değerde inhibe ederken, β -merkaptetanol aktivitede artışına sebep oldu. Metaloenzim inhibitörü olan Etilen Diamin Tetra Asetik Asitin (EDTA) özellikle %5 konsantrasyonunda aktiviteyi azaltması enzimin metal bağlama bölgesine sahip olduğunu göstermiştir. Enzimin substratlarla olan ilişkisi incelendiğinde kazein ve azokazeinin aktivitede değişiminde olumlu etkileri olurken, hemoglobinin, jelatin ve BSA' nın aktivitede azalmaya sebep olduğu görülmüştür.

PROTEASE ENZYME PRODUCTION AND CHARACTERIZATION FROM *ASPERGILLUS NIGER*, REPRODUCED IN MEDIA FROM ORGANIC WASTE

SUMMARY

Within the scope of this thesis; In order to produce the optimum protease enzyme, media are prepared from fruit and vegetable waste, carbohydrate-based and high protein (animal or vegetable) organic wastes, and the growth potential of the enzyme in these media is at different pH (5.0, 5.5, 6.0) and different incubation times (24, 48, 72 hours) were investigated by the Taguchi method. Considering the levels with the highest signal-to-noise (S/N) ratio calculated by the Taguchi method, an incubation time of 24 hours at 30 °C, a pH value of 5.5, and a 50:50 vegetable and animal protein ratio for optimum enzyme production medium was found to be used. It was determined that the factor affecting the analysis the most was the protein ratio, which had the greatest value in the removal efficiency, and then the incubation time and pH value affected the activity, respectively. Proteins are polymers formed as a result of the polymerization of amino acids, and the amount and type of each amino acid differs according to the protein source. For example, the amino acids contained in animal and vegetable proteins are different, and the differences also affect the type of protease. Proteases are classified as serine protease, cysteine protease, acidic protease and metalloproteases depending on the functional amino acid radical in their active sites. Among the vegetable proteins in the composition of the medium prepared in our study, pulses contain amino acids such as acidic acid, lysine, glutamic acid and arginine. Animal proteins contain all 20 amino acids, including cysteine and serine, enzymes that protease uses to break down protein [33]. Looking at the results, the medium with equal amounts of vegetable and animal protein was preferred for protease production, but it is still known that animal proteins are richer in amino acids compared to vegetable proteins for enzyme production. When the amount of animal protein is increased to 70%, an increase in activity occurred, but the yield obtained at an equal rate could not be achieved at this value. 60%-40% rate had a significant decrease in protease enzyme activity. For this reason, it would be a more logical approach to provide a balance rather than giving weight to one of the vegetable or animal proteins. It was observed that the prolongation of the incubation period, the increase in the pH value and the ratio of animal protein caused a decrease in the activity value. As the incubation period increases, the decrease in enzyme production is due to the other compounds in the medium and the deterioration of the solid substrate structure used over time. Enzyme production by the microorganism in a short time provides an important advantage. Enzyme production increases linearly as the optimum incubation time approaches, but gradually decreases after the peak growth time. The reason for this can be shown that the decrease and deterioration of the nutrients in the fermentation medium and the accumulation of waste materials in the environment accelerate the transition of bacteria to the death phase and the production in the death

phase is lower than the stationary phase. After calculating the most productive medium, the composition of the medium was examined and according to the analysis results; The humidity in the broth was found to be 97.96%. Ash determination results were calculated as 0.41%. The protein ratio of the medium is 0.6 g/100g; total sugar 3.61 g/100; oil 0.26g/100g; polysaccharide was found to be 0.81 g/100 g.

Protease enzyme produced from *A. niger* is partially purified and biochemically purified by triple phase separation (TPP) system, which is used to purify a range of enzymes and proteins with high recovery and purity levels, which has become a versatile bioseparation tool with a wide range of applications. characterizations were studied. To find the ammonium sulfate/t-butanol ratio at which purification is best, use different ammonium sulfate saturations (30%, 40%, 50%, 60%, 70% and 90%) and different homogenate/t-butanol ratios (1.0:0), .5, 1.0:1.0, 1.0:1.5 and 1.0:2.0) enzyme activities were calculated. After these calculations, the protease enzyme was purified 13.15 times with a yield of 235.7% with 1.0:1,5 (raw enzyme solution: t-butanol ratio) and 80% saturated ammonium sulfate concentration by TPP system. The molecular weight of the purified protease enzyme was calculated using the Maldi Tof device and its molecular weight was found to be 15.56 kda.

This phase was used in characterization studies since it was determined that the enzyme was collected in the lower phase. In order to see the pH value showing the optimum effect on the purified protease enzyme, enzyme activity values were measured by using buffers at different pH values containing 0.65% casein. 0.1 M sodium phosphate was used for pH 6.0-8.0, Tris-HCl for pH 7.0-9.0 and glycine-NaOH for pH 9.0-11.0. It was determined that the protease enzyme had the best activity in pH 10 glycine-NaOH (pH 9.0-11.0) buffer. Some buffers were used for stable pH determination on the purified protease enzyme. 0.1 M sodium phosphate was used for pH 6.0-8.0, Tris-HCl for pH 7.0-9.0 and glycine-NaOH for pH 9.0-11.0 and activity values were checked. It was determined that the protease enzyme had the best activity in pH 9 100 mM Tris-HCl buffer. In order to determine the optimum temperature on the protease enzyme, the activity values were checked at temperatures between 20°C and 90°C. The obtained data were shown in graphs and charts. In the light of these results, it was determined that the optimum temperature was 60°C. In order to determine the stable temperature value of the protease enzyme, the activity values were measured between 20°C and 90°C and incubation times of 15, 30, 60 and 90 minutes. Graphs and charts were created with the results obtained from the analyzes. It was observed that protease provided the best activity at 60°C temperature and at the end of 60 minutes with a value of 98.91%. Compared to other temperature values, it was observed that it was the temperature that best preserved its activity for varying periods of time. At the end of the 120 min incubation period at 20 °C, 30 °C and 90 °C, a visible loss of activity was detected in the activity. In order to examine the effect of oxidizing agent H₂O₂ and surfactants on the purified protease enzyme, surfactants such as SDS, Tween-20, Tween-80, Trion X-100 at 1% and 5% concentrations and H₂O₂ (oxidizing agent) were prepared and the activity was determined by interacting these solutions with the enzyme for 30 minutes. When the results were examined, it was observed that 1% SDS caused a significant loss of activity in the enzyme activity, while 5% SDS completely inhibited the activity of the enzyme. It was determined that the enzyme activity was preserved up to 87% in the presence of 1% H₂O₂. As a result, it was determined that as the concentration of the surfactants increased, the effect on the activity of the enzyme increased. In order to examine the effect of protease enzyme on inhibitors, 1 mM and 5 mM solutions from

DTNB, EDTA, PMSF and β -mercaptoethanol, and 1 mM and 8 mM solutions from urea were prepared and kept for 30 minutes by interacting with the enzyme, and activity was measured at the end of the time. Enzyme untreated with inhibition solution was used as control and accepted as 100. When the results are examined, it is seen that the enzyme inhibits approximately 95% of its activity in the presence of 1% PMSF, and inhibits almost all of it at 5%. The presence of β -mercaptoethanol at two concentrations caused an increase in activity. A significant decrease in enzyme activity, also in the presence of EDTA, led to the conclusion that the enzyme has a metal binding site. The inhibitory effect of PMSF, a serine-specific inhibitor, on the enzyme indicates that there is an alkaline serine protease in its active site. The fact that the alkaline serine protease enzyme, which was examined in our study, is very popular in the world and has a wide area of use in the industry, shows the importance of the study. In order to determine the activity values of the protease enzyme on various substrates, activity measurements were made using 0.65% concentration casein, BSA, hemoglobin, gelatin and azokazein substrate solution prepared in 100 mM pH 8.5 Tris-HCl buffer. The obtained values are shown in Table 3.11. The protease enzyme showed the best activity in the presence of casein. Casein was followed by azokazein hemoglobin, gelatin, and finally BSA.

The results obtained in the study are important because the researches of biotechnology on industrial enzymes are also gaining importance. The reason for this can be shown as the development of enzyme technology day by day, expanding product usage areas and very high economic value. Some of these studies are on the production of enzymes from waste because in today's world, the population is increasing day by day and therefore it is inevitable to consider the fact of increasing waste generation and take the necessary action. Especially due to the inherent biodegradable properties of fruits and vegetables, the amount of waste obtained from them amounts to about 50 tons per year, of which only 0.5% is allocated as input for various processes, the rest is thrown away. For this reason, nowadays, the focus is on regeneration of resources from wastes, which are abundant as a by-product of any process.

The results of the present study clearly show that organic wastes, which are inexpensive substrates, can be used as a potential source for protease production. Proteases account for more than 60% of global industrial production, and therefore this study gains importance in terms of the enzyme market, because isolation of microorganisms that produce new alkaline proteases that accelerate reactions and have high resistance to adverse conditions is also important. In addition, rapidly developing industrialization provides the world with a perennial raw material need for products. In this regard, if the generated waste requirements can be met, a significant reduction in the production cost can be achieved. Therefore, in our study, essential parameters were optimized for the easy, fast and cost-effective production of protease.

1. GİRİŞ

1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Biyokimyasal katalizörler olan enzimler, spesifik reaksiyonları gerçekleştirmek amacıyla canlı organizmalar tarafından üretilirler ve reaksiyonları yüksek verimle gerçekleştirir [1]. Enzimlerin büyük bir çoğunluğu enzimatik aktivite için gereklidir ve kofaktör denen yapılara ihtiyaç duyar. Diğer bir kısmı ise sadece protein yapısıyla fonksiyon gösterir. Haloenzim, kofaktörlü enzimlere denirken; apoenzim, protein kısımlarına denilmektedir. Biyolojik makromoleküller olan enzimler genel olarak özgülük ve seçicilik, yüksek katalitik aktivite gibi özelliklere sahip protein olarak da tanınırlar [1]. Metabolik olaylar için çok önemlidirler ve yüksek katalitik aktiviteleri ile pek çok reaksiyonu gerçekleştirebilirler [2]. Enzimlerin kimyasal katalizörlerden farklı olmasının en önemli nedeni de özgül olmalarıdır. Hem substrat seçiminde hem de katalizlediği reaksiyon seçiminde oldukça spesifiktirler. Herhangi bir değişikliğe uğramaksızın aktivasyon enerjisini düşürerek ve dengeye daha çabuk ulaşmasını sağlayarak yalnızca reaksiyon hızını arttırırlar [3]. Katalizör faaliyetleri gerçekleşirken pH, substrat yüzeyi, substrat konsantrasyonu, sıcaklık, enzim konsantrasyonu ve inhibitör aktiviteörlerden etkilenirler [4].

İnsanoğlu tarafından enzim kullanımı yüzyıllar öncesine dayanır ve geçmişten günümüze enzimler üzerinde pek çok araştırma yapılmıştır. Endüstriyel enzimler ile ilgili çalışmaların önem kazanması, teknolojinin gelişmesi, kullanılan ürünlerin kullanım alanlarının artması ve ekonomik değerinin yüksek olması gibi sebeplerden kaynaklanır [5]. Çalışmaların ilki mide salgısıyla etin sindirilmesi üzerinedir. Bu çalışmayı 1812 yılında Gottlieb Sigismund Kirchof tarafından tükürük enzimleri üzerine yaptığı çalışma takip etmiştir [2]. Bu çalışma nişastanın glikoza dönüşebildiğini ve enzimin katalizör olarak görev aldığını gözler önüne sermiştir. İlerleyen yıllarda şekerin mayayla alkole fermentasyonu; fermenterler tarafından bu reaksiyonun katalizlendiği Louis Pasteur tarafından incelenmiştir. Hücre dışında da reaksiyonların devam ettiği keşfedilmiştir ve Frederic W.Künhe bu molekülleri enzim

olarak isimlendirmiştir. Enzimler üzerine yapılan çalışmalar yirminci yüzyılın sonlarına doğru artmıştır. 1947 yılında, James B. Sumner tarafından ilk kez enzim saflaştırılması gerçekleştirilmiştir ve enzimlerin saflaştırılması, çalışmaları aydınlatmada oldukça etkili olmuştur [1, 2].

Endüstrinin hemen hemen her alanında enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır ve bu enzimler genellikle mikrobiyal kökenli olmaktadır. Mikrobiyal kaynaklı enzimler daha sık kullanılır çünkü bitkisel ve hayvansal enzimlere kıyasla kalitatif aktiviteleri daha yüksektir. Buna ek olarak mikrobiyal kaynaklı enzimler diğerlerine nazaran daha dayanıklı, daha uygun fiyatlıdır [6]. Katalizör ve enzimlerle karşılaştırıldığında yüksek özgüllük ve yüksek katalitik etkinliklere sahip oldukları gibi çevreyle dost, toksik olmayan, gereksiz yan ürünleri oluşturmayan, biyodegrede edilebilir olmaları, düşük enerji ihtiyacı ve ekonomik olmaları gibi özelliklerinden dolayı endüstrilerde kullanımı yaygınlaşmıştır [7]. Tekstil, kâğıt, hayvan yemi, içecek ve yiyecek, yakıt, deterjan, deri, ilaç, kozmetik gibi pekçok farklı endüstride kullanım yeri vardır. Mikrobiyal enzim grubundan olan proteaz, ilkel organizmalarda aminoasidin oluşumu ve protein katabolizması için gereklidir.

Mikrobiyal enzimler, toksik bileşenleri ve aminler, nitriller, fenolik bileşikler gibi atıkları degradasyon ya da dönüşüm yoluyla ortadan kaldıracırlar [6]. Bunun yanında mikrobiyal enzimler enzim eksikliği tedavisinde de oldukça başarılıdır. Örnek gösterilirse, kalıtsal konjenital sukroz izomeraz eksikliği olan hastalar sukrozu sindiremezler ve bu nedenle sakkarosidaz (β -fruktofuranozid fruktohidrolaz, EC 3.2.1.6) enzimi sakkarozun sindirimini kolaylaştırmak için oral olarak verilir. Bunun yanında fenilalanin amonyak liyaz (EC 4.3.1.24), genetik fenilketonüri bozukluğunda, fenilalanini indirgemek amacıyla kullanılır. Enzimlerin tanı ve ilaç endüstrilerinde çok önemli işlevleri mevcuttur. Enzimler diyabet ve ELİSA test kitleri gibi tanı işlemleri, sindirim bozukluklarıyla ilişkili sağlık konularında ve enzimatik eksiklik tedavisinde terapötik ilaç olarak kullanılır [8]. Bu gibi sebeplerle enzim uygulamaları endüstri alanında olduğu kadar tıpta alanında da geniş uygulama alanı bulmuştur. Son zamanlarda mikrobiyal enzimlerden olan proteolitik enzimler yanık olaylarında ölü deriyi uzaklaştırmak amacıyla kullanılır. Bunların yanında enzimlerden diğer sağlık sorunları ve diyabet hastalığının belirlenmesi için de yararlanır [7]. Enzimler genetik mühendisliği alanında özellikle aminoasit manipülasyonlarında elzemdirler. Örneğin DNA polimeraz PCR'da, DNA amplifikasyonu için kullanılır; restriksiyon

endonükleaz, DNA'nın spesifik bölgelerini kesmek için moleküler klonlamada kullanılır [9].

1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler katalizledikleri reaksiyonun ya da substratlarının çeşidine göre adlandırılmaktadır ve buna göre 6 sınıfa ayrıldığı bilinmektedir. Ayrıca her enzimi tanımlamak için Uluslararası Enzim Komisyonu (IUBMB), EC olarak bilinen bir enzim kod numarası ve de sistematik bir isim verdikleri bir sistem geliştirmişlerdir.

E.C tarafından örnek konulan enzim kod numaralarında; enzimin ait olduğu ana bölüm (sınıf) ilk sayıda, alt sınıf ikinci sayıda, alt-alt sınıf ise üçüncü sayıda ve son olarak ise alt-alt sınıftaki enzimin seri numarası dördüncü sırada yer alır [10, 11].

Enzim sınıfları, komisyon numaraları ve reaksiyon mekanizmaları tablo 1.1.'de görülmektedir.

Tablo 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması ve reaksiyon mekanizmaları.

Enzim Komisyon Numarası	Enzim Sınıfı	Reaksiyonun Mekanizması
EC 1	Oksidoredüktazlar	Bir molekülden bir diğerine elektronların aktarımını (hidrit iyonları veya H atomları) gerçekleştirirler.
EC 2	Transfereazlar	Bir molekülden diğerine atomların grup aktarım tepkimelerini gerçekleştirirler
EC 4	Liyazlar	Çift bağlara grupların eklenmesi veya grupların uzaklaşması sonucu çift bağ oluştururlar. Böylece bağlar hidrolizden farklı bir prensip kullanarak parçalanır.
EC 5	İzomerazlar	İzomerik yapıların oluşumunu molekül için grupların transferi ile gerçekleştirirler, atomları yeniden düzenleyerek bir substratın yapısını değiştirirler.
EC 6	Ligazlar	ATP gibi bileşiklerin yardımıyla gerçekleşen kondensasyon reaksiyonları ile yeni bağların oluşmasını sağlarlar ve oluşan biyosentetik reaksiyonlara bu enzimler katılırlar.

1.2.1. Mikrobiyal enzimler

Dünyada enzimlerin %80'ini mikrobiyal kökenli enzimler oluşturur ve günümüz endüstrisinde de çok sık kullanılır [12]. Mikrobiyal enzimlerin avantajları arasında sıcaklık ve pH kontrollü büyük ölçekli üretim, mevsimsellikten bağımsız, tarımsal atık olarak ucuz substratların kullanılması yer alır [13].

Hayvansal ve bitkisel enzimler de mevcut olmasına rağmen endüstride mikrobiyal enzimlerin tercih edilme sebepleri arasında;

1. Mikroorganizmaların hızlı gelişimiyle birlikte enzim üretiminin hızının da artması,
2. Bitki ve hayvan enzimleri ile kıyaslandığında eldesinin onlara nazaran daha rahat olması,
3. Alan tasarrufu sağlayıp, düşük maliyetli kaynakların tercih edilebilmesi,
4. Genetik mühendisliği gibi yollarla mikroorganizmaların manipüle edilebilmesi,
5. Optimize edilebilmesinin daha kolay olması,
6. Olağandışı koşullarda dahi stabilitesinin yüksek olması,
7. Düzenli bir kaynak olması ve dalgalanmalara mahal vermemesi,
8. Sahip olduğu yüksek katalitik aktivite gibi sebepler endüstriyel uygulamalar güvenilir bir kaynak gösterilmesine örnek verilebilir [5, 14].

1.2.2. Multienzimler

Multienzimler kapsamlı bir sisteme sahip olarak tanınır ve iki çeşit enzimden daha fazlasını içererek tek enzimlere kıyasla kooperatif etki ve fonksiyonel entegrasyon gibi avantajlara sahiptir. Bu enzimler üretim, işleme, remediasyon gibi komplike sistemler için yüksek potansiyellere sahiptir [10]. Deterjan, gıda ve yem endüstrisinde önemli derecede rol oynamaktadır fakat yine de günümüz şartlarında bu enzimi üretmek adına verimli bir biyoproses bulunmamaktadır. Bu nedenle bazı geleneksel yollara başvurulur ve temelde üç yöntem kullanılır; birinci yöntemde doğrudan farklı enzimlerin karışımını içerir fakat bu metot ekonomik yönden elverişsizdir. Diğer metotta çoklu fonksiyonlara sahip mikroorganizmaların saf kültürü kullanılır. Konakçı hücreler için bir yük oluşturan çoklu genler, pratik uygulamayı engeller. Üçüncü metot ise iyi şekilde dizayn edilmiş çeşitli mikroorganizmalardan meydana gelen bir kültürdür ve dikkat çekicidir. Bunun nedeni olarak karışık kültürdeki bireysel

mikroorganizmaların değişime uğraması ve biyoürünlerin verimli üretimi için mikroorganizmalar arasındaki etkileşimler fonksiyonel entegrasyon bakımından yararlanması gösterilebilir. Bunun yanında çoklu bileşiklerin ayrılması ve saflaştırılması yalnızca tek bir kültür ile mümkün olabilmektedir [15].

1.2.3. Termofilik enzimler

Enzimlerin denatüre olmaları için gereken sıcaklık genellikle 50-60°C' nin üzerindeki sıcaklıklardır ve bu sıcaklıkta aktivitelerini kaybeder ve denatüre olurlar. Fakat termostabil enzimler yüksek derecede reaktive (daha düşük difüzyonel kısıtlamalar, daha yüksek reaksiyon hızı), daha az kontaminasyon problemi, daha düşük viskozite, daha yüksek proses verimi ve daha yüksek kararlılık gibi sebeplerle avantaj sağlar. Biyoteknolojik proseslerde potansiyel kullanım sebebiyle termostabil enzimler dikkat çekici ve caziptirler [16].

1.3. Proteazlar

Mikrobiyal enzim grubundan olan proteaz, ilkel organizmalarda aminoasidin oluşumu ve protein katabolizması için gereklidir. Basit yıkıcı olarak görev alan enzim protein evriminin en erken aşamasında oluşmuştur. Proteinlerin peptit bağlarının hidrolizini katalize eden bu enzim proteolitik enzimler veya peptidazlar olarak da isimlendirilir. Peptitleri ve amino asitleri serbest bırakır ve gıdanın bileşimi, süreci ve bozulması üzerindeki etkileri nedeniyle gıda endüstrisinde büyük önem taşır. Fonksiyonel ve aktif gruplarına göre altı ana başlık altında sınıflandırılır. Bunlar; glutamik asit proteazlar, aspartil proteazlar, serin proteazlar, metallo proteazlar, sistein proteazlar, treonin proteazlardır [11].

Enzimlerin büyük kısmı mikrobiyal kaynaklardan gelir ancak daha yüksek bitki organlarından ekstrakte edilen bitkisel proteazlar, son yıllarda gıda endüstrisinde potansiyel proteolitik enzimler olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bunların çoğu sistein proteazlardır (papain, bromelain, zingibain ve ficain). Bütün bu sistein proteazlar, geniş bir sıcaklık ve pH aralığındaki aktivite özelliklerinden dolayı önemli bir ticari önem kazanmıştır. Mikrobiyal proteazların üretiminde, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Rhizopus* gibi bazı mantar suşları ve *Bacillus* cinsi bakterileri genellikle güvenli olduğu düşünüldüğünden öne çıkmaktadır [10]. Öncelikli olarak büyüme ortamlarında yüksek derecede enzim sağlama kapasitesiyle *Aspergillus* türlerinin mikrobiyal proteazları

bilinmektedir. *A.niger* ve *A.oryzae* şuşlarından üretilen proteazlar sis oluşumunu kısıtlama ve leke çıkarmada kullanılır. Ayrıca *A. oryzae* ve *A. sojæ* şuşlarından elde edilen proteazların ise ızgaralık etler üzerinde gevrekleştirmeye yardımcı oldukları tespit edilmiştir. Son zamanlarda *A. clavatus* ES1'in hücre dışı ağartıcı kararlı alkalın proteaz üreticisi olduğu ortaya çıkmıştır. Yüksek aktiviteye sahip oldukları pH aralığına göre proteazlar alkalın (pH 8.0 ile 13,0), nötr (pH 6,0 ile 8,0) ve asidik (pH 2,0 ile 6,0) olarak gruplandırılmaktadırlar. Asit proteazlar temel olarak fungus kökenlidir. Nötr proteazlar genellikle gıda endüstrisinde; ekmek yapımında, sağlık sektöründe kullanılmaktadır. Alkali proteazlar ise deterjan sanayisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Serin proteazlar genellikle alkalın pH'da, pH 7,0 da aktiftirler ve aktif bölgelerinde bir serin grubu taşırlar. Düşük molekül (15-35 kDa) ağırlığındadırlar ve birçok endüstriyel fonksiyona sahiptirler. Aspartik proteazlar diğer bir deyişle asidik proteazlar katalitik aktivite amacıyla aspartik asit rezidüleri olan endopeptidazlardır. Sistein proteazların katalitik faaliyetleri amacıyla histidin ve sistein rezidülerini olan ve genelde sistein ve sistein proteazlar HCN gibi indirgeyici ajanlar varlığında aktif proteaz grubudur. Metalloproteinazlarda faaliyetler için divalent metal iyonu gerekli olmaktadır. Metalloproteinazların büyük bölümü katalitik faaliyet amacıyla çinko iyonları gerektirir fakat kabalt, manganez, bakır gibi iyonlar da gerekli olabilir ve EDTA gibi şelatlayıcı ajanlarla intibededirler [17, 18].

1.3.1. Proteazın biyoteknolojik uygulamaları

Mikrobiyal proteazlar endüstriyel enzimlerin en büyük grubudur ve bütün enzimlerin yaklaşık olarak %60'lık kısmını oluştururlar. Bununla birlikte en çok çalışılan hidrolitik enzimler arasında olan mikrobiyal proteazlardır. Endüstriyel üretimde gıda, deri işleme, atık işleme, gümüş kazanım, deterjan ve kimyasal endüstrisi, tekstil, deri, fotoğraf ve medikal araştırmalar gibi endüstriyel alanlarda sayısız uygulaması vardır [19].

1.3.2. Deri işleme endüstrisi

Deri endüstrisinde ham deriyi işlemek amacıyla asitle temizleme, ıslatma, kireci çıkarma, kıl çıkarma, yağ alma, kireç serpmesi gibi son deri ürünü ortaya çıkana kadar birçok kimyasal muamele yapılır. Kılı çıkarmak için mikroorganizma tarafından üretilen alkalın proteazlar oldukça etkilidir. Alkalın proteaz, globulin, deri

işleminde albümin gibi proteinleri kaldırır ve derinin kollajen olmayan bileşenini hidroliz eder [20, 21].

1.3.3. Atık işleme endüstrisi

Katı atık sorununa yol açan kollajen, kıl, tüy, yün ve diğer keratin yapıların hidrolizinde önemli bir yere sahip olan keratinazın mikrobiyal kaynakları geniş çaplı substrat özelliği nedeniyle atık işlemede faydalıdır [21, 22].

1.3.4. Yiyecek endüstrisi

Hamurun viskozite özelliklerinin iyileştirilmesi, çeşitli protein hidrolazların hazırlanması, bira arındırması, tahıl ezme, proteince yüksek diyetlerin hazırlanması, hamur kalitesinin artırılması, et çözüldürmesi, et yumuşatılması, yüksek besin değerli balık protein konsantresi çözüldürülmesinde ve proteazların başlıca uygulaması olan peynir yapımının pıhtılaştırma aşamasında proteazlardan yararlanır [20]. Yüksek özgülüğünden ötürü peynir yapımında buzağı rennin tercih ediliyorken artık zamanla yerini mikrobiyal proteazlara bırakmıştır. Gıdaların kalite ve sindirilebilirliğini arttırmasının yanında alerjenik bileşiklerini azaltarak sağlıklı gıdaya üretimine yardımcı olmaktadır [10].

1.3.5. Gümüş kazanımı

Değerli bir metal ve ana maliyet bileşeni olan gümüşün geri kazanımı oldukça zordur ve zahmetlidir. Gümüş geri kazanımı için filmin yakılması ve metalik gümüşün oksidasyonu gibi çevre dostu olmayan çeşitli kimyasal yöntemler vardır. İlaç endüstrisinde yavaş salımlı dozaj formlarının hazırlanması, film jelatin tabakasını aktif olarak indirgemek ve sınırlı gümüşü serbest bırakmak, gümüş kurtarmak için X-Ray filmlerinde kullanılan biyo işleme amacıyla alkalın proteazlar kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak medikal ve endüstriyel uygulamalarda kullanılır. Örnek vermek gerekirse; proteazlar çok seçici peptik bağ parçalanması amacıyla protein dizlemede, tripsin hayvan hücre kültürlerinin korunmasında ve proteinaz K nükleik 16 asit izolasyonunda büyük ölçüde kullanılmaktadır [23].

1.3.6. Deterjan endüstrisi

Deterjan endüstrilerinde amilaz, lipaz gibi çeşitli enzim tipleri de kullanılır ama deterjan endüstrisinde proteazlar toplam enzim pazarının yaklaşık olarak %60'lık

kısmını oluşturur. Kullanılan ideal proteaz deterjanla uyumlu ve alkalın pH'da stabil olmalıdır [10].

1.3.7. Kimyasal endüstrisi

Proteazlar sentetik kimyasal endüstrisinde peptik üretiminde biyokatalizör olarak önemlidir. Temelde, biyoaktif peptitler üretmek amacıyla en çok kullanılan yöntem mikrobiyal proteinlerin hidroliziyle gerçekleştirilir. Bunlara ek olarak susuz ortamda enzim aktivitesininin azaltması bu uygulamanın önemli dezavantajıdır [20].

1.3.8. Medikal araştırmalar

Kanser, iltihaplanma, tümör gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde mikrobiyal kaynaklardan elde edilen proteazlar etkilidir. Proteazlar katalitik aktiviteye ek olarak hücre sinyalleme, hücre göçü, metastaz, doku düzenleme, apoptoz, kan pıhtılaşması, hücre adezyonu ve çeşitli biyokimyasal yollarda ve metastaz gibi fizyolojik fonksiyonlarda etkin bir ajan olarak kabul görür. Anti-kanser ilaçlarının geliştirilmesinde proteaz inhibitörü kullanılarak bu tür proteazların mikrobiyal inaktivasyonu alternatif bir yol olarak tercih edilmektedir. Kanser tedavisinde enzim kullanımının kemoterapötik ajanlara göre toksisite açısından bakıldığında avantajlı olduğu görülmektedir [21].

1.4. Mikroorganizmalar

1.4.1. *Aspergillus*

Çok hücreli ökaryotik mikroorganizma olan küfler organik maddeler üzerinde, doğada toprakta, havada, suda çoğunlukla görülür [11]. Aerobik olan *Aspergillus* türleri de bol oksijenli, nemli hemen hemen her ortamda kolaylıkla gelişebilir. Bu tür, hif olarak isimlendirilen ve hücre zincirlerinden oluşan iplikli mantar türlerini kapsamaktadır ve aşağı yukarı iki yüz mantar türünden oluşmuş bir cinstir [13]. Atmosfere dağılan sporları toz ve diğer parçacıklarla kolayca taşınabilir veya sporları havada asılı kalabilir [11]. *Aspergillus*'lar organik maddelere ayrıştırarak saprofit olarak yaşamalarını ürettikleri enzimlere borçludurlar. Uygun şartlar meydana geldiğinde insanlarda, bitkilerde ve hayvanlarda patojen hale geçerek özellikle bağışıklık sistemi düşük canlılarda ortaya çıkan "*Aspergillosis*" adı verilen solunum sistemi hastalığına yol açabilirler [23]. *Aspergillus* ekolojik, tıbbi ve ekonomik yönden önemli cinstir.

Farklı türlerden sağlanan laktaz, katalaz, selüloz, pektinaz, lipaz, vb birçok enzim bulunur ve bu enzimler gıda sanayisinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır [24].

1.4.2. *Aspergillus niger*

A. niger aerobik koşullarda organik maddeler üzerinde bulunan filamentli mantardır ve doğada çürüyen bitkiler üzerinde, toprakta ve çöpte gelişir. Nemli ve sıcak bölgelerde havayla dağılan konidyosporların verimli üretimiyle geniş yayılım göstermektedir. Optimum üreme sıcaklığı (6-47°C) gelişme sıcaklığı ise 35-37 °C arasında değişiklik gösterir. Bunlara ek olarak pH aralığında (1.4-9.8) gelişir. Filamentli mantar olan *A. niger* fenotipinde fazla çeşitlilik olur. Yer küresinde denizel ve karasal türler olarak bulunmaktadır ve organik asitler ile hidrolitik enzimleri yüksek miktarlarda üretmektedir [24].

Onlarca yıldır araştırma ve endüstriyel kullanımın konusu olan *A. niger*, siyah *Aspergilli*' nin üyesi olan, biyoteknolojide gıda bileşenleri, endüstriyel enzimlerin üretiminde ve ilaçlarda çoğunlukla kullanılan önemli mikroorganizmalardandır. Bu çeşit ilk kez 1919'larda sitrik asit fermantasyonuyla üretildiğinde endüstriyel olarak kullanılan organizma haline gelmiş ve 1960'lardan günümüze *A.niger* gıda endüstrisinde, meyve suyu, nişasta, fırıncılık, meyve suyu ve gıda endüstrisinde kullanılan çeşitli enzimlere kaynak oluşturmaktadır [25].

Besin maddelerinin biyopolimerde salınması amacıyla gerekli olan türlü enzimleri salgılayan bu tür, yüksek salgılama kapasitesiyle daldırma ve katı fermentasyonda endüstriyel olarak kullanılır. Uzun yıllardır zengin enzim kaynağı olan *A. niger* hücre dışı (besin) enzimleri üretmek için kullanılmaktadır. İlk üretilen enzimler amiloglikozidaz, pektinaz ve proteazdır [11]. Son yirmi yıl içinde, *A. niger*' in önemli bir konakçı olarak geliştirilmesinin nedeni gıda enzimlerini aşırı eksprese etmesidir. *A. niger*'i üretim süreçlerini iyileştirmek ve yabancı proteinler için bir ekspresyon sistemi olarak kullanmak için gen teknolojisi iyi bir şekilde uygulanmıştır [24].

Alerji ve mikopatoloji ile ilgili bir problem diğer filamentli mantarlarla karşılaştırıldığında problem görülmemiştir. Sadece yoğun toza maruz kalan kişilerde nadirde olsa, aşırı duyarlılık reaksiyonları gözlemlenmiştir. Bu sebeple *A. niger* endüstriyel kullanım amacıyla güvenli bir üretim organizması olması için iyi üretim uygulama kurallarına uymalıdır [25].

1.5. Enzim Saflaştırma Stratejisi

Enzim saflaştırma işlemi önemlidir çünkü hücrelerde binlerce çeşit protein içeriği bulunur, bir proteinin aminoasit dizilimini ve özelliklerini tanımlayabilmek için onun diğerlerinden ayıran özelliklerinden faydalanarak saf hale getirmek gerekir. Enzim saflaştırmanın ana stratejisi en düşük maliyetle en yüksek saflık oranına ulaşmaktır [26]. Bu strateji belirlenirken enzim kaynağının bulunabilirliği, enzim aktivitesinin korunması ve mümkünse artması dikkat edilen hususlardan birisidir çünkü saflaştırma stratejisinde zaman ve maliyet oldukça önemlidir. Enzim aktivitesinin korunması ve enzim muhafazasını sağlamak amacıyla yapılan işlemler her zaman +4° C'de yapılmalıdır [10].

1.5.1. Üçlü faz ayırma sistemi (TPP)

İlk kez 1972'de Tan ile Lovreinla tanımlanan ve şimdilerde geniş bir uygulama alanına sahip, protein çökelmesinin kollektif pek çok basamağını kapsayan çok yönlü bir biyoayırma aracı haline gelen üç fazlı bölümlenme veya TPP (Three-phase partitioning), yüksek geri kazanım ve saflık seviyelerine sahip bir dizi enzim ve proteini saflaştırmak için kullanılır. Proteaz, invertaz, pektinaz, a-galaktosidaz, tripsin inhibitörü, lakkaz, katalaz gibi enzimleri saflaştırmak için yaygın olarak kullanılır [10, 11].

Endüstrideki potansiyel kullanımlar göz önüne alındığında, geri kazanım ve saflaştırılma için basit ve verimli yöntemlerin geliştirilmesi arzu edilir hale gelmektedir. Yapılan tüm çalışmalar, TPP'nin geleneksel kromatografik yöntemlere kıyasla enzimlerin birincil saflaştırılması için çekici bir işlem olduğunu göstermiştir. Kromatografik teknikler basit ve etkili endüstriyel yöntemler olarak kullanılamayacak kadar karmaşık olduğundan, TPP'nin hayvan veya bitki materyallerinden bazı endüstriyel proteazları çıkarma ve saflaştırma potansiyeli göz ardı edilemeyecek kadar başarılıdır. Ayrıca kromatografik tekniklerle ayırmalarda genelde fazla miktarlarda uçucu organik çözücüler kullanılır zaman alıcıdır, pahalıdır, birden çok adım sayısı içerir ve ayrıca ölçeği büyütme zordur fakat oda sıcaklığında 1 saatten daha az bir sürede gerçekleşmesi, hızlı olması ve prosesde kullanılan kimyasallar ile yeniden kullanılabilir olması TPP yönteminin en büyük avantajlarından biridir. Yöntem büyük ölçekli ekstraktla kolaylıkla çalışabilmekte ve kolayca

ölçeklenebilmektedir. Basit, verimli, ekonomiktir ve tek adımda yüksek geri kazanımla enzimler saflaştırılabilir [11, 12, 26].

TPP sistemi, yiyecek, kozmetik, mikroorganizmaların yanı sıra küçük moleküllü organik bileşik içeren çok çeşitli biyoaktif moleküllerin hayvanlar, bitkiler vb. türlü doğal kaynaklardan enzim inhibitörleri, enzim, protein, karbonhidratlar, yenilebilir yağların etkin şekilde saflaştırılması amacıyla kullanılır. Örneğin; domatesten pektinazın, havuçtan fosfolipaz D'nin, turptan peroksidazın, *E. coli*'den ekstrakte edilen yeşil floresan proteinin, ragiden proteaz inhibitörünün, tavuk bağırsağından alkalın fosfatazın saflaştırılmasında TPP yöntemi kullanılmıştır [27].

100 den fazla araştırmada TPP sistemi kullanılmıştır. Bu çalışmaların yaklaşık olarak %70'lık kısmında proteinlerin saflaştırılması ve enzimler olurken %30'luk kısmında karbonhidratların saflaştırılmasında, yağlarda ve küçük moleküllü organik bileşikler çalışılmıştır [11, 26].

1.5.2. TPP ayırma mekanizması

Genel anlamda ayırma işlemlerinin kombinasyonunu içeren TPP yönteminin tam olarak mekanizması literatürde tanımlanmamıştır fakat salting out, ozmolitik elektrostatik kuvvetler, kozmotropik konformasyon sıkılaşması, çökeltme, izo-iyonik çökeltme, protein hidrasyon kaymaları vb. ayırma işlemlerinin çeşitli kombinasyonları ara fazda protein çözülmesinde neden olur [10, 12].

Bu metot enzimleri saflaştırmak için uygulanır ve protein içeren süspansiyona ya da ham ekstrakta öncelikli olarak sulu inorganik tuz (çoğunlukla $(NH_4)_2SO_4$) yeterli miktarda eklenir, ardından bir organik çözücü (genel olarak t-bütanol) eklenerek karıştırılır. Amonyum sülfat üzerine t-bütanol eklenmesi ile birlikte, t-bütanol proteini çözeltilinin dışına doğru itmeye başlar. Çoğunlukla bir saat sürenin sonundaki santrifüj işleminin ardından t-bütanollü alt suyu ile üst organik faz arasında çözelti ortaya çıkar. Üst kısımdaki t-bütanol fazı, protein bakımından zengin ara faz ve enzim bakımından zengin olan alt sulu faz olarak üçe ayrılır. Pigmentler, enzim inhibitörleri, lipitler ve diğer polar olmayan bileşikler üst fazında toplanırken sakkaritler gibi bazı polar bileşikler, kontaminantlar, hücre debrisisi vb. alt sulu fazda zenginleşir [6].

1.5.3. TPP prosesini etkileyen faktörler

TPP ayırma işlemleri sırasında işlemi etkileyen ve farklılandıran bazı faktörler vardır ve amonyum sülfat ve t-bütanol miktarları arasında proteinleri çöktürmek için karşılıklı ilişki söz konusudur [11]. Üst ve alt hidrasyon kaymaları süspansiyona ek olan amonyum sülfat ve t-bütanol miktarlarının durumuna göre farklılık gösterebilmektedir. Genelde başlangıç çözeltilisinin ml başına 0.2-0.5 ml t-bütanol oranı yeterlidir [10].

1.5.3.1. Amonyum sülfat

Yüksek derecede çözünürlüğü ve iyon gücü sebebiyle amonyum sülfat protein çöktürme için en fazla tercih edilen inorganik tuzdur. Ayrıca amonyum sülfat ucuz olduğundan, kolayca bulunabildiğinden, proteinlere karşı hassas olduğundan ve de bulunan iyonlar bazı proteinlerin yapısını, makromoleküllerdeki moleküller arası etkileşimleri stabilize ettiğinden dolayı da popülerdir [27]. Prensipite salting out etkisini amonyum sülfat iyonu beş farklı biçimde gösterir. Bunlar; kosmotropi, sülfat iyonunun proteinin pozitif yan zincirlerine bağlanması, boş yüzey gerilimi, ozmatik basıncın artması, iyonik şiddet etkisi ve yabancı ajanların uzaklaştırılmasıdır. TPP sisteminde amonyum sülfat konsantrasyonu veya doygunluğu maksimum geri kazanım elde etmek için kritik öneme sahiptir çünkü çökmesinden ve protein-protein etkileşimlerinden sorumludur. Yüksek miktarda tuzda, su molekülleri güçlü pretein-protein etkileşimlerine sebep olur, tuz iyonları ile adsorbe edilir ve hidrofobik etkileşimle protein moleküllerinin çözülmesinde etkilidir. Çöktürmenin etkinliği sırasıyla $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarına ve çözeltilinin iyonik gücüne bağlıdır. Bu sebeple amonyum sülfat konsantrasyonunun başta %20 oranında optimize edilmesi kritik öneme sahiptir. Çünkü daha fazla tuz çözeltilinde, su molekülleri tuz iyonları ile çekilerek daha güçlü protein-protein etkileşimiyle sonuçlanır [28].

1.5.3.2. T-bütanol

T-Bütanol, çok çözünür ve iyonik olmayan bir C4 kozmotropudur. Suda karışabilir ancak katı tuzun eklenmesinden sonra hidratlanır ve farklılaştırıcı bir çözücü görevi görür [27]. T-bütanol dallanmış yapısı ve büyüklüğü nedeniyle proteinin artmış üç boyutlu yapısının içerisine kolaylıkla nüfuz edilemediğinden enzimin denatürasyonuna neden olamaz. T-bütanol konsantrasyonu TPP yönteminde çok önemlidir. Yüksek konsantrasyonlarda protein denatürasyonu ve protein çözelmesine

engel olabilir düşük t-bütanolde ise konsantrasyonları amonyum sülfat ile yeterince sinerjize olmamaktadır. Bunlara ek olarak TPP işlemi sırasında t-bütanol miktarı artırılması hedef ürünün verimini artırmaz nedeni ise t-bütanol miktarının artırılması, çözeltinin viskozitesinde artışa neden olur. Viskozite artınca molekülün hareketliliği azalır ve molekülün etkileşime girmesi zorlaşır. Bu sebeplerden ötürü bu yöntemde kullanılan t-bütanolün miktarının iyi belirlenmesi önemlidir [10, 12].

TPP esnasında çöken proteinlere t-bütanol batmama özelliği kazandırır. Toplam aktivite ve spesifik ara fazın tamponda tekrar çözünmesiyle birlikte geri kazanılır. Sülfat iyonunun yüksek konsantrasyonu, geleneksel yöntem olan tuzda çözündürme vb., kozmotropide TPP'nin mekanizmasının hepsini oluşturmaz ama kozmotrop davrandığı gibi t-bütanolde daha yüksek sıcaklıklarda ve oda sıcaklığında kozmotrop davranır. Protein konformasyon sıkışıklığında meydana gelen, elektrostatik kuvvetler, kuvvet, protein hidrasyon kaymaları da önemli faktörlerdendir [29].

1.5.3.3. pH

TPP yönteminde enzimler farklı pH' larda farklı davranışlar gösterirler. Proteinlerin yüzeyinde aminoasit rezüdülerinde değişimlerinin meydana gelmesi proteinlerin ayırma işleminde pozitif etkiye sahip olan pH değişimiyle alakalıdır. Genelde proteinler, izoelektrik noktalarına (pI) ulaştıkları zaman çökelmeye başlar. İsoelektrik noktada bulunan pH da proteinler net sıfır yüküdür. pH' ın değişmesi proteinlerin net yükü düşük pH değerinde pozitif olurken, yüksek pH da negatif olur [30].

TPP sisteminde pH değeri izoelektrik pH' ın üstünde olması durumunda protein suyu fazla olur bunun nedeni ise protein yüzeyindeki aminoasit kalıntılarının net negatif olarak yüklenmesidir. Bunun zıttına, TPP sürecinde pH değeri izoelektrik pH' in altındaysa iyonik etkileşimler dağılımından üstün olacak ve pozitif yüklü proteinler sulu alt faza doğru dağılarak protein ara fazla çökecektir [12, 28].

1.5.3.4. Sıcaklık

Düşük sıcaklık gereksinimi bildirilmesine rağmen TPP ayırma işlemlerinde sıcaklığın TPP'nin performansında önemli etkiye sahiptir. Sıcaklığın öncelikli etkisi saflaştırılan proteinin yapısı üzerine olmaktadır. Genellikle 25-60 °C çalışma aralığı enzimlerin optimum çalışma aralığıdır. Bu yüzden birçok çalışma, 20-40°C'lik bir sıcaklık

aralığının TPP yöntemi için optimal olduğunu göstermiştir. Eğer yüksek sıcaklıklarda çalışılırsa proteinin üç boyutlu yapısı deformasyona ve denatürasyona uğrayacak ve enzim aktivasyonu, verimi olumsuz etkilenecektir. Üstelik sıcaklık 40°' den fazla olduğunda t-bütanolün çözümün hacmi azalır ve uçuculuğu yavaşça artar. Amonyum sülfat ile sinerjik etki daha az miktarda t-bütanol oluşması durumunda azalır ve daha düşük ekstraksiyon verimi olur. Bunlara ek olarak TPP işlemi daha büyük enerji tüketimi ve daha yüksek sıcaklığa yol açar [28, 29].

BÖLÜM 2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan organizma

A. niger MRC 200806 saf kültürleri Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Prof. Dr. Arzu Çağrı Mehmetoğlu kültür koleksiyonundan elde edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan alet ve cihazlar Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Tez çalışmasında yararlanılan alet ve cihazlar.

Araç Gereçler	Model-Üretici Firma
Su Banyosu	Nüve
Buzdolabı	Kirsch
Etüv	Heraeus
Hassas Terazi	Explorer
Otoklav	Daihan Scientific
pH Metre	Metler Toledo
Santrifüj	Mega Star
UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu
Çeker Ocak	Esco
Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Vorteks	Velp Scientifica
Deep- Freeze	Kirsch
Mutfak Robotu	Fakir

2.1.3. Çalışmada faydalanılan kimyasal maddeler

Tez çalışmasında faydalanılan kimyasal maddeler Tablo 2.2' de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Tez çalışmasında faydalanılan kimyasal maddeler.

Kimyasallar	Şirket
Amonyum Sülfat	Merck Germany
Sodyum Karbonat	Tekim Kimya Sanayi Tic.LTD.Şti.
Sodyum Kazeinat	Kimbiotek Kimyevi Maddeler San.ve Tic.A.Ş.
Triklorik Asit	Sigma
Etil Alkol	Sigma
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Sigma
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Scharlau
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Scharlau
t-bütanol	Sigma
Coomassie Brilliant G-250	Fluka
Fosforik asit	Sigma
Bovin Serum Albumin	Sigma
TSA (Tryptic Soy Agar)	BioMerieux SA
TSB (Tryptic Soy Broth)	BioMerieux SA
Fenilmetansülfonilflorür (PMSF)	Sigma
Trizma Base	Sigma
Hidroklorik Asit (HCl)	Carlo Erba
DNTB (5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)	Sigma
Folin-Ciocalteau	Sigma
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma
Glisinin	Merck Germany
Asetik asit	Kimya lab
Tirozin	Simple Nutritions
Üre	Sigma
Tween 20-Tween 80	Scharlau
TritonX-100	Scharlau
Azokazein	Sigma
BSA	Himedia
Hemoglobin	Sigma
Jelatin	Sigma

2.1.4. Tezde kullanılan tampon ve kimyasal çözeltiler

2.1.4.1. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

Tris – HCl Tamponu (100 mM pH 8,5); Trisma base kimyasalından 0,605 g tartıldı ve üzerine 40 mL distile su ilave edilip çözündürüldü. Daha sonra 1 M'lık HCl ile pH değeri 8.5'a ayarlandı ve ardından çözeltinin hacmi saf su ile 50 mL' ye getirildi.

%0,65 (w/v) Kazein İçeren Çözelti; Kazeinden 0,325 g tartıldı ve üzerine pH değeri 8,5 olan 40 ml 100 mM' lık Tris-HCl tamponundan eklendi. Kazein tamamen çözündüğü ana kadar NaOH ilave edildi. Ardından pH 8,5' e ayarlandı ve çözeltinin son hacmi saf su ilave edilerek 50 ml' e tamamlandı.

Triklorik Asit Çözeltisi (110 mM TCA); TCA' dan 0,895 g tartıldı ve 50 ml saf su içinde çözündürüldü.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (0.5 M Na₂CO₃); Na₂CO₃' den 2,65 g ve çözünmesi için 50 ml saf su içinde karıştırıldı.

Folin-Ciocalteau (0,5 M F-C Reaktifi); F-C reaktifinden 25 ml ölçüldü ve saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlandı.

2.1.4.2. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler

Coomassie Brilliant Blue G-250 Çözeltisinin Hazırlanışı: Boyadan 100 mg tartıldı ve % 95' lik etil alkolden 50 ml ile çözündürüldü. Ardından karışıma %85' lik 100 mL fosforik asit eklendi ve son hacim distile su ile 1 L' ye tamamlandı. Son olarak boya kalıntılarından uzaklaştırmak amacıyla filtre kağıdıyla süzüldü ve homojen bir boya çözeltisi elde edildi.

Standart serum albümin çözeltisi (1 mg/ml): 25 ml saf su içinde 25 mg standart serum albümini çözündürülerek hazırlandı.

2.1.4.3. Kullanılan inhibitör çözeltilerinin hazırlanışı

1. β - merkaptoetanol çözeltisi(1 mM ve 5 mM): 5 ml Tris-HCl (pH 8,5) içinde 35 μ l β - merkaptoetanol çözüldü ve bu şekilde bir stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden ise 1 mM ve 5 mM' lık çözeltiler hazırlandı.

2. Fenilmetansülfonilflorür çözeltisi (1 mM ve 5 mM): PMSF' den 1 mM için 0,017 g; 5 mM için ise 0,087 g tartıldı ve tartılan madde 5 ml etonel içinde çözündürüldü.

3. DNTB çözeltisi (1 mM ve 5 mM): 1 mM için 0,078 g ve 5 mM için 0,39 g DNTB tartılarak 10 ml tampon çözeltide çözündürüldü.

4. EDTA çözeltisi (1 mM ve 5 mM): 1 mM için 0,039 g ve 5 mM için 0,196 g EDTA tartılarak Tris-HCL (pH 8,5) tamponunda çözüldü ve ardından hacim distile su ile 5 ml' e tamamlandı.

5. Üre çözeltisi (1 mM ve 5 mM): 1 mM için 0,604 g ve 5 mM için 3,02 g tartılarak 50 ml distile su içinde çözünmesi sağlandı.

2.1.4.4. Yüzey aktif madde çözeltilerinin hazırlanışı

1. Triton X-100 (%1 ve %5): %1 'lik çözelti için 0,3 ml; %5' lik çözelti için 0,5 ml ölçüldü ve distile su ile 30 ml' e tamamlandı.

2. Tween-20 (%1 ve %5): %1 'lik çözelti için 0,3 ml; %5' lik çözelti için 0,5 ml ölçüldü ve distile su ile 30 ml' e tamamlandı.

3. Tween-80 (%1 ve %5): %1 'lik çözelti için 0,3 ml; %5' lik çözelti için 0,5 ml ölçüldü ve distile su ile 30 ml' e tamamlandı.

4. . Tween-80 (%1 ve %5): %1 'lik çözelti için sodyum dodesil sülfattan 0,3 g; %5' lik çözelti için 0,5 g tartıldı ve distile su ile 30 ml' e tamamlandı.

2.1.4.5. Doğal substratlar ile hazırlanan çözeltiler

1. % 0,65 konsantrasyonda kazein çözeltisi: 0,195 g kazein tartılarak 30 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda son hacim 30 ml olacak şekilde çözündürüldü.

2. % 0,65 konsantrasyonda azokazein çözeltisi: 0,195 g azokazein tartılarak 30 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda son hacim 30 ml olacak şekilde çözündürüldü.

3. % 0,65 konsantrasyonda BSA çözeltisi: 0,195 g BSA tartılarak 30 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda son hacim 30 ml olacak şekilde çözündürüldü.

4. % 0,65 konsantrasyonda hemoglobin çözeltisi: 0,195 g hemoglobin tartılarak 30 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda son hacim 30 ml olacak şekilde çözündürüldü.

5. % 0,65 konsantrasyonda jelatin çözeltisi: 0,195 g jelatin tartılarak 30 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda son hacim 30 ml olacak şekilde çözündürüldü.

2.2. Yöntem

2.2.1. *A. niger*'in çoğaltılması

Sporulasyon ortamı olarak TSA (Tyryptic Soy Agar) besiyeri kullanıldı. Seyreltilmiş örneklerden steril öze yardımıyla TSA besiyeri bulunan petrilere çizgi ekim tekniğiyle ekim yapıldı ve 30 °C'de 72 saat süresince inkübasyona koyuldu. İnkübasyondan sonra 7 ml sıvı TSB besiyerine 100 mikrolitre bakteri inoküle edilerek 30°C'de 72 saat boyunca inkübe edilerek çoğaltıldı. Stok kültür hazırlamak amacıyla ise üç gecelik saf kültürler uzun süre dayanması için derin dondurucuda saklandı (sıvı besiyerinde üretilen üç gecelik kültürden 350 µl + 650 µl gliserol). Çoğaltılan kültür, enzim üretiminde kullanılması için aşı kültür görevi gördü.

2.2.2. Fermantasyon ortamının optimizasyonu

2.2.2.1. Uygun besiyeri içeriğinin belirlenmesi

Proteaz üretimi için en uygun besiyerini tespit etmek amacıyla Taguchi (3x3) yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntemin temel adımları; faktör ve etkileşimlerin tespiti, her faktörün ayrı şekilde seviyelerinin belirlenmesi, doğru orthogonal matrisin tespit edilmesi, etkileşim ile birlikte faktörlerin orthogonal matrislerin sütunlarına aktarılması, deneylerin gerçekleştirilmesi, optimal seviyelerin ve verilen analizin belirlenmesi ve son olarak doğrulama deneylerinin yapılması şeklinde sıralanabilir [31]. Taguchi yöntemiyle, proteaz aktivitesinde hangi parametrelerin etkili olduğunu tespit etmek amacıyla Tablo 2.3'de belirtilen değerler denenmiştir.

Tablo 2.3. Deneyde kullanılan parametreler ve seviyeleri.

	pH	İnkübasyon Süresi
%50-%50	5,0	24
%50-%50	5,5	48
%50-%50	6,0	72
%60-%40	5,0	48
%60-%40	5,5	72
%60-%40	6,0	24
%70/%30	5,0	72
%70/%30	5,5	24
%70/%30	6,0	48

Tablo 2.4. Organik çöplerin sınıflandırılması.

Besin Grubu	İçindekiler
Hayvansal Protein	Kuşbaşı et, yumurta, beyaz peynir,kaşar peyniri
Bitkisel Protein	Nohut
Karbonhidrat	Makarna, Erişte, Pirinç
Meyve-Sebze	Kabak, havuç, marul, salatalık, ananas, limon, elma, ayva, kereviz, maydanoz, patlıcan

Kredi ve Yurtlar Kurumu yemekhanesinden alınan organik çöpler hayvansal-bitkisel protein, meyve-sebze ve karbonhidrat olarak sınıflandırıldıktan sonra blender yardımıyla ufak parçalara ayrıldı ve püre haline getirildi. Besiyeri hazırlamak için gıda artığı numunelerinden Tablo 2.4 'de verilen gramajlarda tartıldı ve toplam ağırlık 50 g olacak şekilde karışım hazırlandı. Üzerine 100 ml saf su eklendi ve homojen bir kıvam elde etmek için tekrardan blender yardımıyla besinler ezildi. Ardından besiyerinin gıda parçacıklarından arınması ve pürüzsüz bir kıvama gelmesi için sıvı, filtre kağıdı yardımıyla filtre edildi. Besiyerinin istenilen aralıkta pH ayarlaması yapıldıktan sonra 100 ml'lik tüplere her biri 30 ml fermantasyon ortamı içerecek şekilde koyuldu ve sterilize etmek için 121 C'de 15 dakika otoklavlandı. Soğutulan besiyerleri 8 mm çapında küf kolonisi ile inoküle edildi ve vortekslendi. İnoküle edilen tüm besiyerleri, 30°C 'de 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübe edildi. Fermantasyon süreleri bitiminde her bir besiyeri, Laf kabininde Buhner hunisi kullanılarak filtre kâğıdı ile süzülde, elde edilen süzüntü ham enzim kaynağı olarak kullanıldı ve her birinin proteaz aktivite ölçümü yapıldı. Tüm analizler üç paralel tekrar ile gerçekleştirildi ve ortalama değerler rapor edildi.

Tablo 2.5. Besiyeri bileşenleri ve gramajları.

	%50-%50	%60-%40	%70-%30
Hayvansal Protein(g)	15	18	21
Bitkisel Protein(g)	15	12	9
Karbonhidrat(g)	10	10	10
Meyve-Sebze(g)	10	10	10

2.2.2.2. Protein oranının proteaz enzimi üretimine etkisi

A. niger' in en iyi proteaz ürettiği besiyeri protein içeriğini belirlemek için %50-50, %60-40 ve %70-30 protein oranlarında hazırlanan besiyerleri otoklavlandıktan sonra 8 mm bakteri kültürüyle inoküle edildi ve Tablo 2.1'de belirtilen inkübasyon süreleri sonunda, her birinden örnekler alınarak enzim aktivite tayini yapıldı.

2.2.2.3. İnkübasyon süresinin proteaz enzimi üretimine etkisi

A. niger' in en iyi proteaz ürettiği zamanı belirlemek için otoklavlanan ve bakteri kültürüyle inoküle edilen besiyerlerinin Tablo 2.1'de pH ve protein oranlarında 24-48-72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda, her birinden örnekler alınarak enzim aktivite tayini yapıldı.

2.2.2.4. pH'nın proteaz enzimi üretimine etkisi

A. niger' in en iyi proteaz ürettiği başlangıç pH'sını belirlemek için Tablo 2.1'de istenilen özelliklerdeki besiyeri pH' ı 5,0-5,5-6,0 aralığında hazırlandı. Otoklavlanan ve inoküle edilen besiyerlerine bakteri kültüründen ekim yapıldı. İnkübasyon sonunda her birinden örnekler alınarak enzim aktivite tayini yapıldı.

2.2.3. Proteaz enziminin üçlü faz ayırma (TPP) yöntemi kullanılarak saflaştırılması

En yüksek enzim üretim ortamı, zaman ve pH belirlendikten sonra enzimin saflaştırılma işlemlerine geçildi. Belirlenen optimum koşullarda enzim üretimi gerçekleştirildikten sonra, fermantasyon ortamı süzülerek enzim kaynağı olarak kullanıldı. Süzüntüdeki proteazın saflaştırılma işleminde üçlü faz ayırma sistemi kullanıldı. Saflaştırma boyunca aktivite ve protein tayinleri yapıldı ve elde edilen verilerle saflaştırma tablosu oluşturuldu.

Üçlü faz yöntemiyle proteaz enzimini saflaştırmadan önce besiyerindeki küf misellerini uzaklaştırmak için filtre kağıdı yardımıyla süzme işlemi yapıldı. Süzme işleminin ardından homojenat hücre kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla 5000 rpm, 24 °C'de 25 dakika santrifüj edildi ve elde edilen homojenat, üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırma işlemi için kullanıldı.

Saflaştırmanın en iyi olduğu amonyum sülfat/t-bütanol oranını bulmak için önce tüplere 2 ml homejenat ölçüldü ve farklı amonyum sülfat doygunluklarına (%30, %40,

%50, %60, %70 ve %90) getirildi. Daha sonra her bir tuz oranı için farklı homojenat/t-bütanol oranları (1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5 ve 1,0:2,0) hesaplanarak gerekli ölçülerde t-bütanol ilave edildi ve her işlem sonrası vorteksleme yapıldı. Oda sıcaklığında 1 saat boyunca beklemenin sonucunda, net bir şekilde üç fazın oluştuğu gözlemlendi. Tekrardan 5000 rpm'de 24 °C'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst faz pastör pipeti ile ayrıldıktan sonra geriye kalan orta faz ve alt faz ayrı tüplere aktarıldı ve orta ve alt fazın protein tayini ve enzim aktivitesi yapıldı. Spesifik aktivite (SA), 1 mg proteine takabül eden enzim ünitesi olarak ifade edildi ve değer basamaktaki enzim aktivitenin (U/ml) yine her basamaktaki protein konsantrasyonuna (mg/ml) bölünmesiyle hesaplandı. Saflaştırma katsayısı (PF), herhangi bir fazda ölçülen enzime ait spesifik aktivitenin homojenatta ölçülen spesifik aktiviteye oranı olarak ifade edildi. Verim ise herhangi bir fazdaki enzim aktivite değerinin enzimin başlangıçtaki aktivitesine oranı olarak hesaplandı.

2.2.4. Proteaz enziminin aktivite tayini

Proteaz enziminin aktivitesi, substrat olarak kazeinin kullanıldığı yöntemin modifiye edilmesiyle belirlenmiştir. Yöntemi uygularken ilk olarak %0,65 konsantrasyonda hazırlanan kazeinden 2,5 ml alındı ve üzerine 0,5 ml enzim çözeltisi eklendi. Ardından reaksiyon karışımını inkübe etmek amacıyla 37°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletildi. Tris-HCl tampon (100 mM pH 8,5) çözeltisi enzim yerine kör için kullanıldı. İnkübasyon sonrası reaksiyonu durdurmak amacıyla 110 mM'lık TCA'dan 2,5 ml eklendi ve tekrardan 37°C'lik su banyosunda 30 dakika bekletildi. Su banyosu sonrası 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj yapıldı ve oluşan süpernatanttan yeni bir tüpe 1 ml alındı. Üzerine Na₂CO₃ (0,5 M) çözeltisinden 2,5 ml ve 0,5 M Folin Ciocalteu reaktifinden 0,5 ml eklendi ve son bir kez daha 30 dakika 37°C su banyosunda bekletildi. Süre sonunda spektrofotometrede 660 nm'de köre karşı absorbans değerlerine bakıldı. 37°C'de, pH 8,5'de gerçekleşen hidroliz reaksiyonu sırasında %0,65 kazeinden 1 µg/dk tirozin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı bir ünite proteaz aktivitesi (U/ml) olarak ifade edilmiştir [10].

2.2.4.1. Tirozin standart eğrisinin hazırlanması

Proteaz aktivitesi hesaplanmasında kullanılmak amacıyla oluşturulan tirozin standart grafiği oluşturmak için öncelikle 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponu ile 1 mg/ml tirozin çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden tüplere 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µl hacimlerde

alındı ve son hacim 100 mM pH 8,5 Tris-HCl ile 1ml'ye tamamlandı. Bu çözeltilerin her birinden 0,5 ml temiz tüplere alınarak üzerine 2,5 ml 0,5 M Na_2CO_3 çözeltilisinden, 0,5 ml 0,5 M Folin reaktifinden ilave edildi. Elde edilen karışım 37 C°de 30 dakika boyunca bekletildi ve spektrofotometrede 660 nm'de köre karşı absorbans değeri ölçüldü. Kör olarak pH'sı 8,5 olan ve 0 µg/ml tirozin içeren 100 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. Elde edilen sonuçlarla absorbans değerinde meydana gelen değişimi gösteren tirozin standart grafiği çizildi ve grafikteki doğrunun eğimi proteaz enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanıldı[12].

Enzim aktivitesi hesaplanmasında kullanılan denklem, denklem 1'de verilmiştir.

$$\text{Proteaz Aktivitesi} = \frac{U}{ml.dk} = \frac{AxB}{CxDxE} \quad (3.1)$$

A: Standart eğriden bulunan değer (µmol)

B: Toplam hacim (ml)

C: Enzim miktarı (ml)

D: İnkübasyon süresi (dk)

E: Kolorimetrik ölçüm için tüpe konulan miktar(ml)

2.2.4.2. Protein tayini (Bradford Metodu)

Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının, çeşitli konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek farklı şiddette mavi renk oluşturması sonucu geliştirilen bu yöntem aynı zamanda protein konsantrasyonu için basit, hızlı ve hassas bir yöntem olduğu için analizde kullanıldı [10]. Bu yöntemde duyarlılık sınırları, total reaksiyon karışımında 5-100 µg protein/ml'dir ve asidik boya proteine bağlanır. Bradford metoduna göre protein tayini yapılırken BSA (sığır serum albümini) standart protein olarak kullanıldı. Bu proteinin boya bağlama kapasitesi yüksek olduğu için tercih edildi. Seyreltilmiş BSA örneklerinin üzerine hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltilisinden 2 ml ilave edildi ve vortekslendi. 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okundu ve elde edilen değerlerle protein standart grafiği çizildi. Protein tayini yapılan numunelerin bilinmeyen protein konsantrasyonları, aynı yöntem

kullanılarak ve standart grafiğın çiziminden elde edilen denklemin formülü yardımıyla hesaplandı.

Protein Standart Grafiğinin Hazırlanışı

Sığır serum albümininin (BSA) 1 mg/ml'lık standart çözeltisi distile su ile hazırlandı ve stok çözelti olarak kullanıldı. Bu çözeltiden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı ve herbirinin hacmi distile su ile 0,1 ml'ye tamamlandı. Kör için ise tipe 100 µl distile su aktarıldı. Ardından tüm tüplerin üzerine hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden 2 ml eklendi ve vortekslendi. 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okundu ve elde edilen değerlerle protein standart grafiğı çizildi. Protein tayini yapılan numunelerin bilinmeyen protein konsantrasyonları, aynı yöntem kullanılarak ve standart grafiğın çiziminden elde edilen denklemin formülü yardımıyla hesaplandı.

2.2.5. Moleküler ağırlığın belirlenmesi

Saflaştırılan proteaz enziminin moleküler ağırlığı Maldi Tof cihazı kullanarak hesaplanmıştır. Analizi Sakarya Üniversitesi/Sargem laboratuvarından Öğr. Gör. Mustafa Mahmut Singil gerçekleştirmiştir.

Saflaştırılmış numunenin analizi için numune 500 mikrolitre (1/1/1 asetonitril/ultra saf su/ ethanol) karışım kullanılarak seyreltilmiştir. Matriks için ise iki farklı şekilde; 5 mg CHCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid), 10 mg sinapinic acid (3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) kullanılmıştır. Matriksler 1000 mikrolitre (50/50/0.1 Asetonitril/ultra saf su/trifluoroacetic acid) karışım kullanılarak seyreltilmiştir. Analiz işlemi 0.5 ml numune ve 0.5 ml matriks çok iyi şekilde karıştırılarak şekilde gerçekleştirilmiştir. Analizde kullanılan aralıklar; Mass Range 1000-4000 Da, Max Laser Repetition Rate 50, Power 95, Profile 100, Shots 20, Pulsed Extraction optised at (Da) 2300 olarak bildirilmiştir.

2.2.6. Proteaz enzimiyle ilgili yapılan kinetik çalışmalar

2.2.6.1. Proteaz enzimi için optimum pH incelemesine yönelik çalışmalar

Optimum pH'nın tespiti için %0,65 kazein ilaveli çeşitli pH değerlerinde sodyum fosfat (pH 6,0-8,0), Tris-HCl (pH 7,0-9,0) ve glisin NaOH (pH 9,0-11,0) tampon çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilere 0,5 ml enzim eklenerek 37°C'de 10 dakika

boyunca bekletildi. Ardından her birine proteaz aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivitenin tespit edildiği pH değeri 100 kabul edildi. Diğer sonuçlar bu değere oranlanarak bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle karşılaştırıldı. Elde edilen veriler, enzim pH profili grafiğinin çiziminde kullanıldı.

2.2.6.2. Proteaz enzimi için pH kararlılığının incelenmesine yönelik çalışmalar

Proteaz enzimin stabil olduğu pH'yı tespit etmek amacıyla sodyum fosfat (pH 6,0-8,0) Tris-HCl (pH 7,0-9,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0-11,0) tamponları kullanıldı. 1 ml tampon çözeltileri üzerine, 1 ml enzim çözeltisi eklenerek 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında bölüm 2.2.4'teki gibi aktivite tayini yapıldı. Farklı pH değerlerinde, inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi. Elde edilen veriler, enzimin pH stabilitesi grafiğinin çiziminde kullanıldı.

2.2.6.3. Proteaz enzimi için optimum sıcaklığın incelenmesine yönelik çalışmalar

Saflaştırılan enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığının belirlenmesi için 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponundan hazırlanmış %0,65 konsantrasyonda kazein çözeltisinin 2,5 ml'i ile 0,5 ml enzim çözeltisi karıştırıldı. Aktivite değerlerinin hesaplanması için 20°C'den 80°C'ye kadar olan sıcaklık değerlerinde 10 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bölüm 2.2.4'teki gibi proteaz aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar bu değere oranlanarak bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle karşılaştırıldı. En yüksek aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık değeri 100 kabul edildi ve diğer sonuçlar bu değere oranlanarak bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle karşılaştırıldı. Elde edilen veriler, enzimin sıcaklık profili grafiğinin çiziminde kullanıldı.

2.2.6.4. Proteaz enzimi için stabil sıcaklığın incelenmesine yönelik çalışmalar

Proteaz enzimin sıcaklık stabilitesini tespit etmek amacıyla pH 8,5 100mM Tris-HCl tamponuyla, 0,5 ml enzim çözeltisi karıştırıldı ve 20°C'den 80°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında 15, 30 ve 60 dakikalık sürelerde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında bölüm 2.2.4'teki gibi proteaz aktivite tayini yapıldı. Farklı sıcaklık değerlerinde, inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 kabul edildi ve

inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi. Elde edilen veriler, enzimin sıcaklık kararlılığı grafiğinin çiziminde kullanıldı.

2.2.6.5. Proteaz aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin incelemesine yönelik çalışmalar

İnhibitörlerden; beta-merkaptoetanol, üre, EDTA ve serin amino asidinin spesifik inhibitörü PMFS çözeltileri proteaz enziminin aktif bölgesinde katalizden sorumlu amino asitlerin varlığını incelemek amacıyla kullanılmıştır. Bu çözeltilerin %1'lik ve %5'lik oranları, ürenin ise %1'lik ve %8'lik oranları hazırlandı. 50 µl enzim, 450 µl tampon ile karıştırıldıktan sonra 30 dk beklendi ve bölüm 2.2.4'teki gibi aktivitesi ölçüldü. İnhibisyon çözeltisi içermeyen enzim çözeltilerinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve inhibitör içeren örneklerin aktivitesi ise kalan aktivite olarak hesaplandı.

2.2.6.6. Proteaz aktivitesi üzerine okside edici ajanın ve yüzey aktif maddelerinin etkisinin incelenmesine yönelik çalışmalar

Yüzey aktif maddelerinden Tween-80, Tween-20, SDS, Trion X-100 ve H₂O₂ (yükseltgen)'nin proteaz enziminin aktivitesi üzerine etkisi incelenmesi amacıyla her birinin %1'lik ve %5'lik tamponları hazırlandı ve 50 µl enzim, 450 µl tampon çözeltileri ile karıştırıldı. Ardından 37°C'de, 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında bölüm 2.2.4'teki gibi proteaz aktivite tayini yapıldı. İnkübasyon öncesi aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi.

2.2.6.7. Proteaz enziminin substratlara karşı özgünlüğünün incelenmesi

Proteaz enziminin substratlardaki aktivitesinin belirlenmesi amacıyla 0,5 ml enzim çözeltisi ile 2,5 ml substrat çözeltisi karıştırıldı ve bölüm 2.2.4'teki gibi proteaz aktivite tayini yapıldı. Substrat çözeltisi olarak pH 8,5 100 mM Tris-HCl tamponunda hazırlanan %0,65'lik hemoglobin, kazeini, jelatin, azokazein ve BSA kullanıldı. Sonuçlar incelendiğinde substrata olan aktivitesi en yüksek olan değer 100 kabul edildi ve diğer sonuçlar bu değere oranlanarak hesaplandı.

3. DENEY SONUÇLARI

3.1. Proteaz Enziminin Üretimi

Mikroorganizmaların gelişmesi için içinde buldukları besiyerinin gereksinim duydukları besinleri içermesi gerekir. İnkübasyonun etkisi ve fermantasyonda amaçlanan sonuca ulaşma derecesi ise çoğunlukla besiyeri formülasyonundaki değişikliklere göre değişmektedir [32].

Proteaz üretimi için *A. niger* stok kültürü ön besiyeri olarak TSA besiyerine ekildi ve 3 gün sonunda hayvansal-bitkisel proteinlerden oluşan gıda artıklarında elde edilen besiyerine 8 mm inokülasyonu yapıldı. Taguchi yönteminde tasarlanan ve Tablo 3.1’de paylaşılan 9 deney ile 24, 48, 72. saatlerde farklı pH ve protein oranlarında, 3 paralel analiz ile proteaz aktivite tayini yapıldı. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak hesaplandı ve *A.niger* bakterisinden elde edilen proteaz enziminin maksimum aktiviteyi 24. saatte ve pH 5,5, %50-50 protein oranında gösterdiği belirlendi. Sonucu doğrulamak için 3 paralel ile aynı işlemler tekrarlandı ve enzim çalışmaları için %50-50 protein oranı, pH 5,5, 24. saat kullanıldı. Tablo 3.1’ de üç paralel analiz sonucunda elde edilen absorbans değerleri yer almaktadır.

Tablo 3.1. Proteaz enziminin oluşmasını etkileyen faktörlerin incelenmesi.

A	B	C			
Hayvansal Protein(%):	pH	İnkübasyon süresi	1.paralel	2.paralel	3.paralel
Bitkisel Protein (%)					
50-50	5.0	24 h	0,920	0,89	0,9
50-50	5.5	48 h	1,199	1,45	1,288
50-50	6.0	72 h	0,138	0,131	0,128
60-40	5.0	48 h	0,098	0,11	0,1
60-40	5.5	72 h	0,104	0,121	0,142
60-40	6.0	24 h	0,452	0,34	0,412
70-30	5.5	24 h	0,835	0,801	0,825
70-30	6.0	48 h	0,49	0,51	0,718
50-50	5.5	24 h	1,314	1,297	1,335

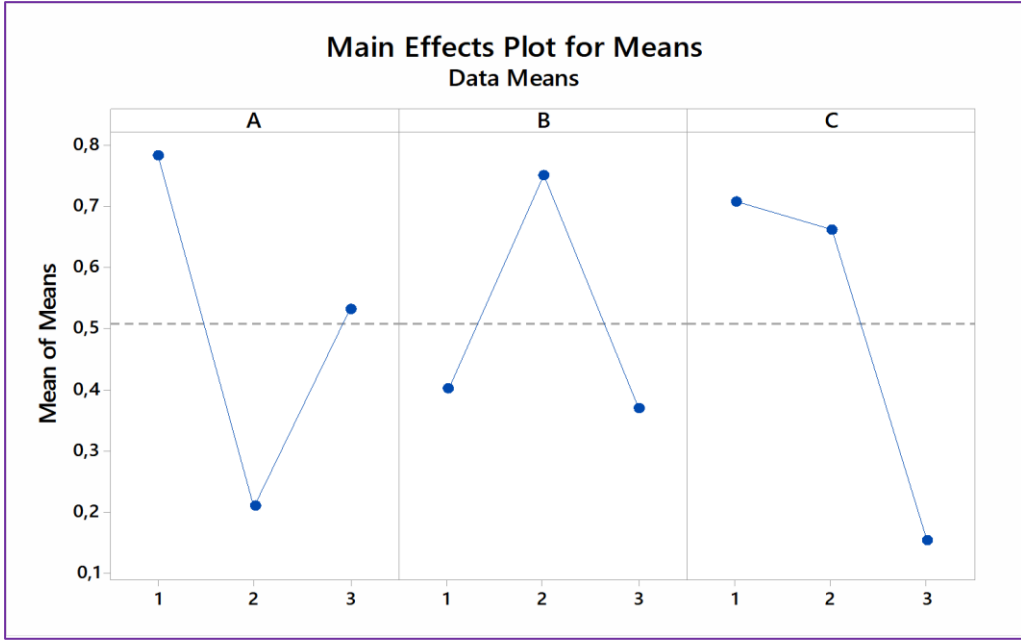
Deney sonuçlarından elde edilen verileri değerlendirmek için sonuçlar S/N oranına (sinyal/gürültü) çevrilmiştir. N gürültü oranını ifade ederken S sinyal faktörünü ifade etmektedir. Gürültü faktörü deney tasarımına dahil olmayan fakat deney sonucunu etkileyen faktörleri ifade ederken sinyal faktörü sistemden elde edilen gerçek değeri ifade eder. Gürültü kaynakları elde edilmesi amaçlanan performans karakteristiklerinin amaçlanan değerden sapmasına neden olan bütün değişkenler olarak açıklanır [31]. Bu nedenle S/N oranındaki N değerinin küçük olması amaçlanan değere yaklaşıldığı anlamına gelmektedir. Kısaca bu çalışmada hedef S/N oranının maksimum seviyede tutmak ve en yüksek etkiyi sağlamaktır. Tablo 3.2'deki değerler incelendiğinde en yüksek etkiyi protein oranının alması aktivite değerini diğer faktörlere göre protein oranının daha çok etkilediği ve daha sonra sırasıyla inkübasyon süresi ve pH değerinin geldiğini görülmektedir. Ana etki grafiğindeki değerler Şekil 3.1'de verilirken, SN oranları için ana etki grafiği Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Deney tasarımı için verim.

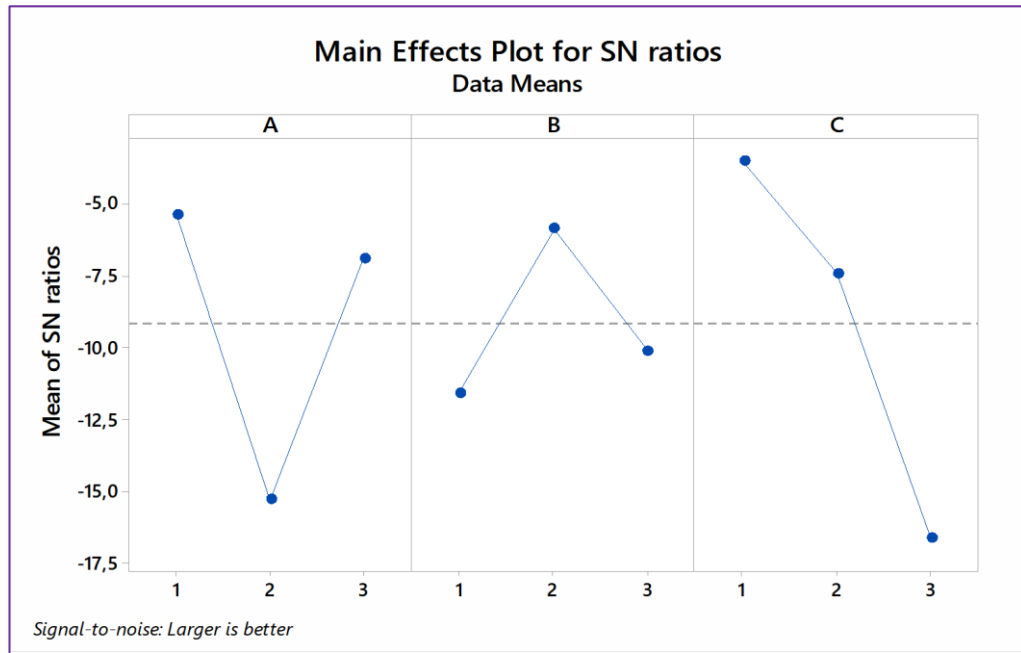
Seviye	Protein Oranı	pH	İnkübasyon Süresi
1	0,7827	0,4014	0,7083
2	0,2088	0,7517	0,6626
3	0,5304	0,3688	0,1510
Ortalama	0,5739	0,3829	0,5573
Sıralama	1	3	2

Tablo 3.3. Sinyal gürültü oranları için yanıt tablosu.

Seviye	Protein Oranı	pH	İnkübasyon Süresi
1	-5,363	-11,569	-3,511
2	-15,317	-5,869	-7,417
3	-6,871	-10,113	-16,623
Ortalama	9,954	5,699	13,112
Sıralama	2	3	1



Şekil 3.1. Deney tasarımı için ana etki grafiği.



Şekil 3.2. SN oranları için ana etki grafiği.

Taguchi yöntemi kullanılarak yapılan hesaplamalara göre parametrelerin optimum seviyeleri çoğunlukla S/N oranının en büyük olduğu seviyelerde meydana gelmektedir. Grafikler incelendiğinde protein oranı parametresinde en yüksek piki birinci seviye vermiştir. Bu durumda %50-50 protein oranının aktivite tayininde en yüksek değeri verdiği gözlemlendi. pH parametresinde en yüksek piki ikinci seviye verdi. Buna istinaden 5,5 pH'ın analizi yapılan değerler arasında optimum değer olduğu tespit edildi. Son olarak inkübasyon süresi faktörü incelendiğinde en yüksek piki

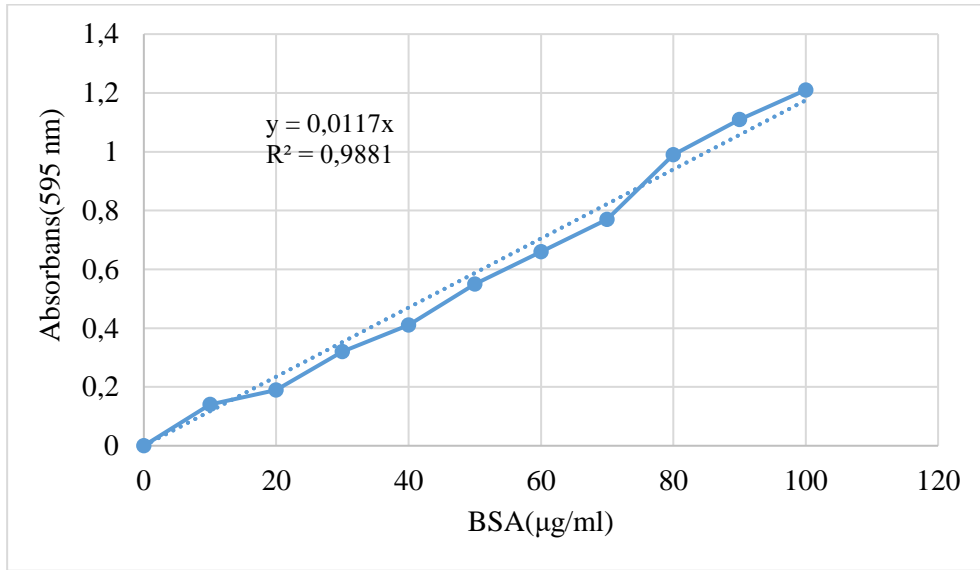
birinci seviyenin verdiği görüldü. Birinci seviye 24 saati temsil ettiğinden 24 saatin aktivite tayininde en verimli süre olduğu tespit edilerek bu değerlerin çalışmamızda tasarımı yapılan besiyeri için optimum değerler olduğu belirlendi.

3.2. Besiyerinin Kompozisyonu

Proteaz üretimi için optimum olduğu belirlenen besiyerinin kompozisyonuna bakılmıştır. Analizler için Radix Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı'ndan hizmet alımı yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre; sıvı besiyerinde rutubet %97,96 olarak bulunmuştur. Kül tayini sonuçları ise % 0,41 olarak hesaplanmıştır. Besiyerinin protein oranı 0,6 g/100g; toplam şeker 3,61 g/100; yağ 0,26 g/100g; polisakkarit ise 0,81 g/100g olduğu tespit edilmiştir.

3.3. Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Bovine Serum Albumin Eğrisi

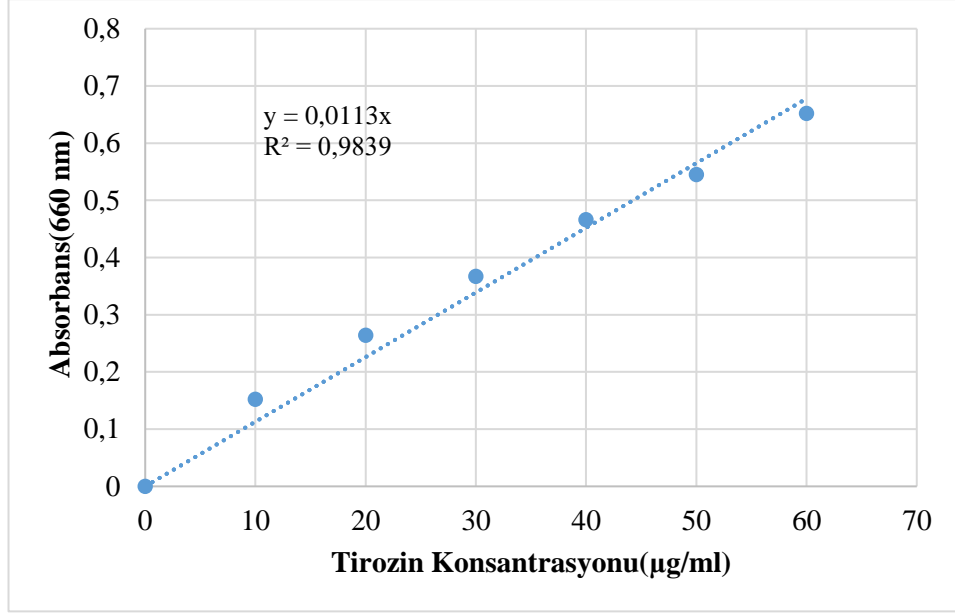
Bu tez çalışmasında protein miktarlarını hesaplamak için Bovine Serum Albumin kullanılarak oluşturulan BSA standart grafiği kullanıldı (Şekil 4.3).



Şekil 3.3. Protein tayininde kullanılan standart grafik.

3.4. Proteaz Aktivitesinin Hesaplanması İçin Tirozin Standart Grafiği

Bu tez çalışmasında hazırlanan tirozin grafiği enzim aktivitesini hesaplamak için kullanılmıştır ve hazırlanan grafik Şekil 3.4' te verilmiştir.



Şekil 3.4. Aktivite hesaplamasında kullanılan tirozin standart grafiği.

3.5. Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi Kullanılarak Enzimin Saflaştırılması

3.5.1. TPP sistemiyle saflaştırılan proteaz enziminin amonyum sülfat ve organik çözügen oranının incelenmesi

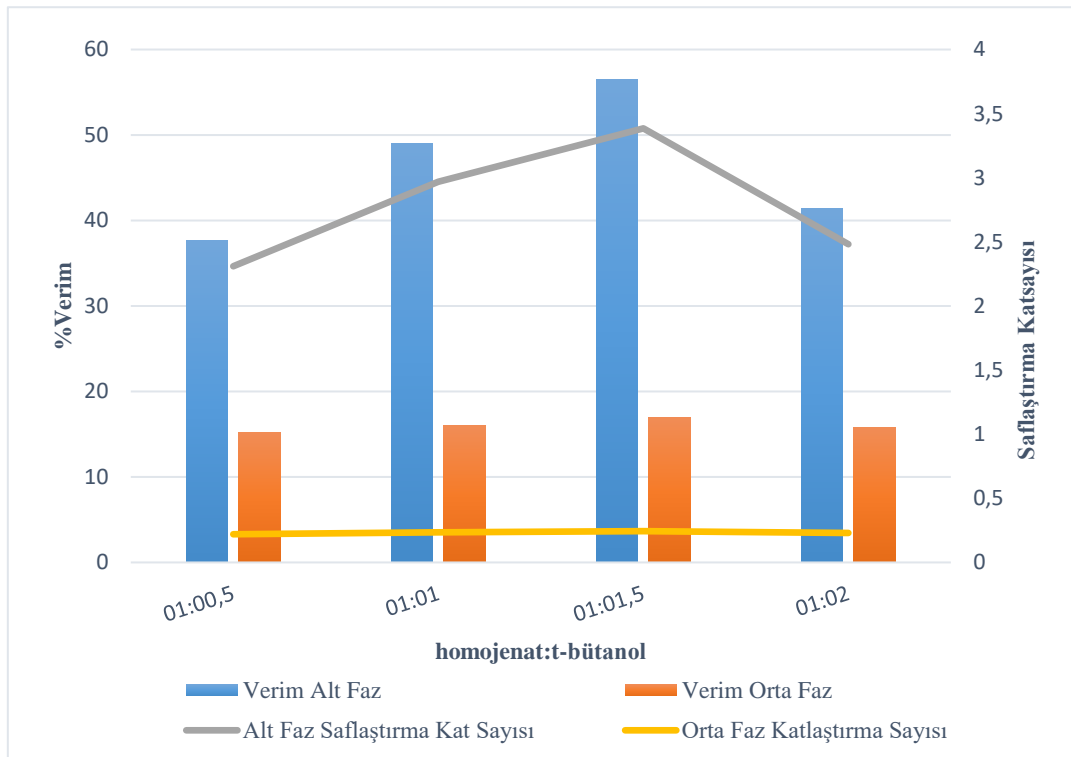
A. niger' den üretilen proteaz enziminin sırasıyla %30, %40, %50, %60, %70, %80 ve %90 konsantrasyonlardaki amonyum sülfat oranları ve 1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:1:2 gibi değişik homojenat:t-bütanol oranları ile yapılan analizler sonrası bulunan verilerle, verim ve saflaştırma katsayıları hesaplandı. Saflaştırılan proteaz enziminin, %80 (w/v) amonyum sülfat ve 1,0:1:1,5 (v/v) homojenat:t- bütanol oranında, alt fazda en iyi % verim ve saflaştırma katsayısını elde ettiği tespit edildi. Karakterizasyon çalışmaları için de bu oranlar kullanıldı.

3.5.2. Proteaz enziminin TPP yöntemiyle saflaştırma sonuçları

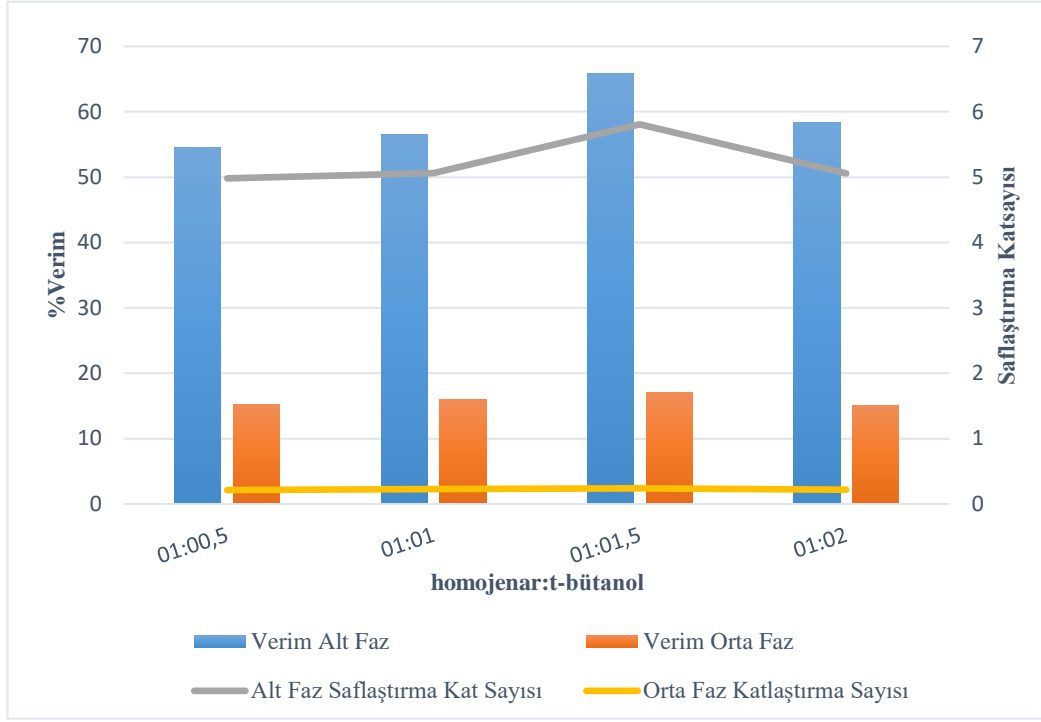
TPP yönteminde %80 (w/v) amonyum sülfat ve 1,0:1:1,5 (v/v) homojenat:t- bütanol oranı kullanılarak proteaz enzimi % 235,172 verim ve 13,5 kat ile alt fazda saflaştırıldı ve sonuçlar Tablo 3.4' de verildi.

Tablo 3.4. *A.niger*'den saflaştırılan proteazın enziminin saflaştırma tablosu.

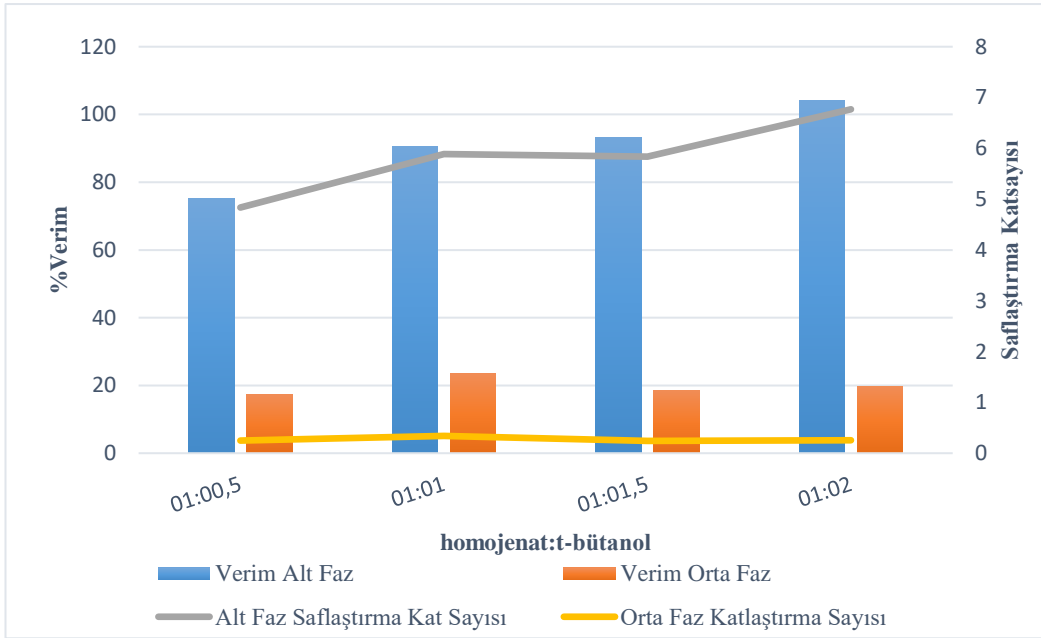
Basamak	Total Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Protein (mg/ml)	Total Aktivite (U)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	2,00	25,85	5,20	51,70	10,40	4,97	100,00	1
Alt faz	2,00	60,79	0,93	121,58	1,86	65,37	235,17	13,15
Ara faz	2,00	14,70	4,90	29,40	9,80	3,00	56,86	0,12



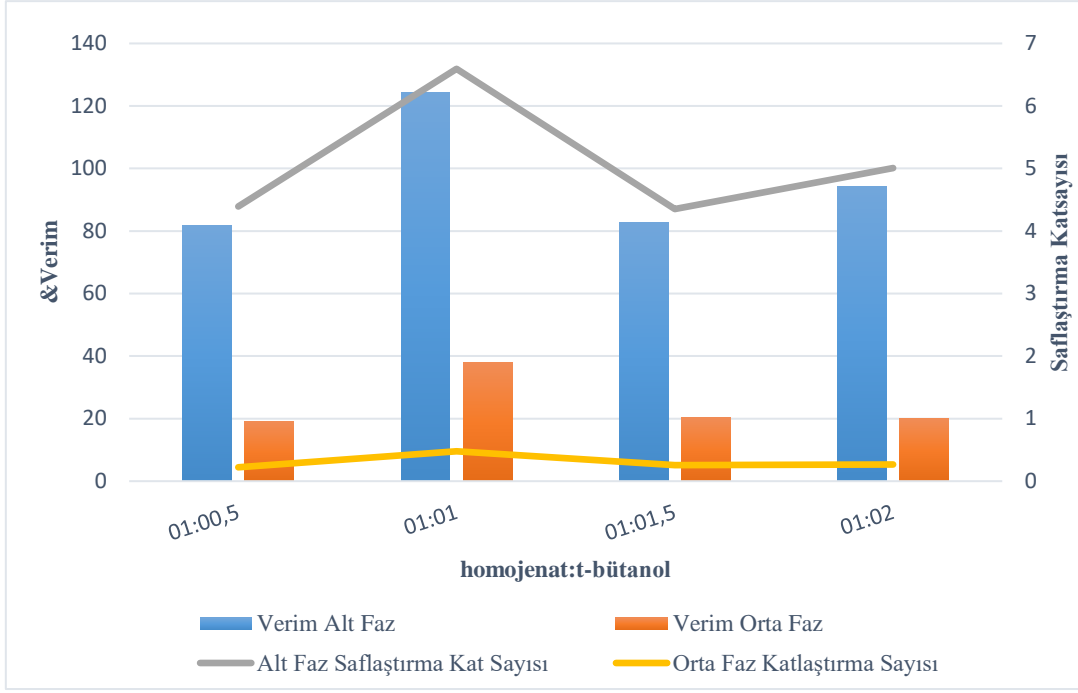
Şekil 3.5. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %30 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi.



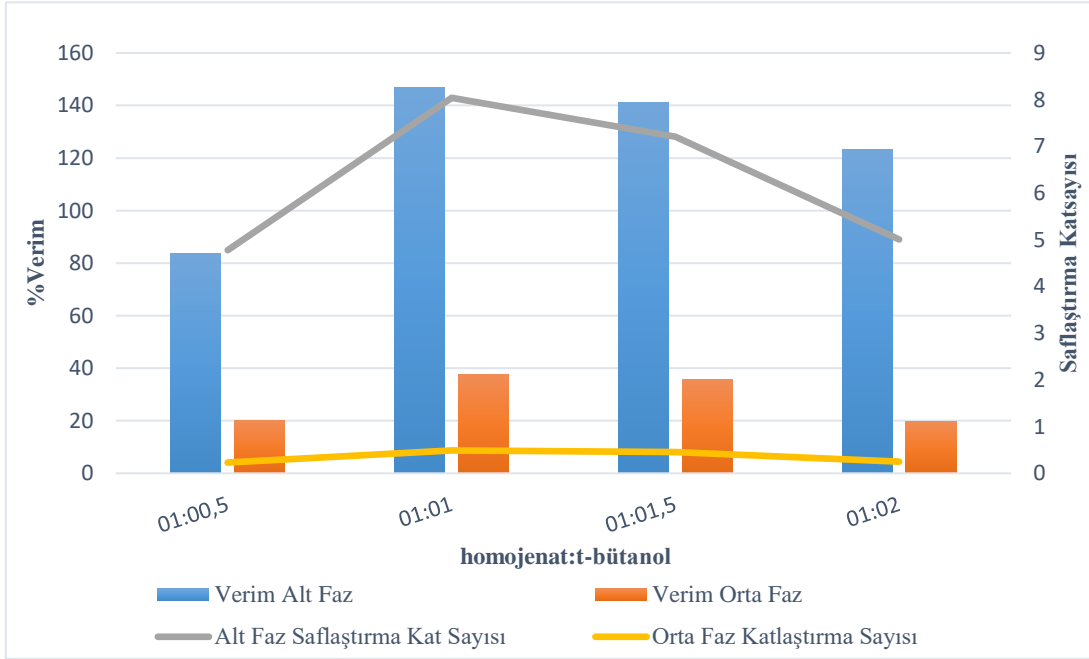
Şekil 3.6. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %40 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi.



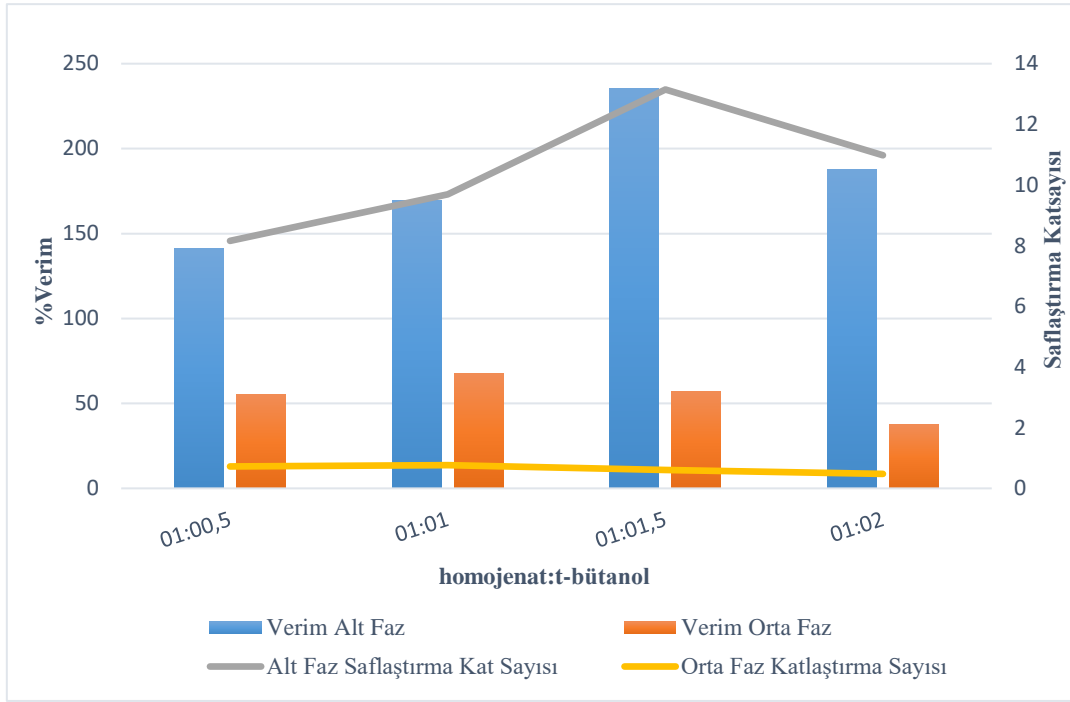
Şekil 3.7. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %50 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi.



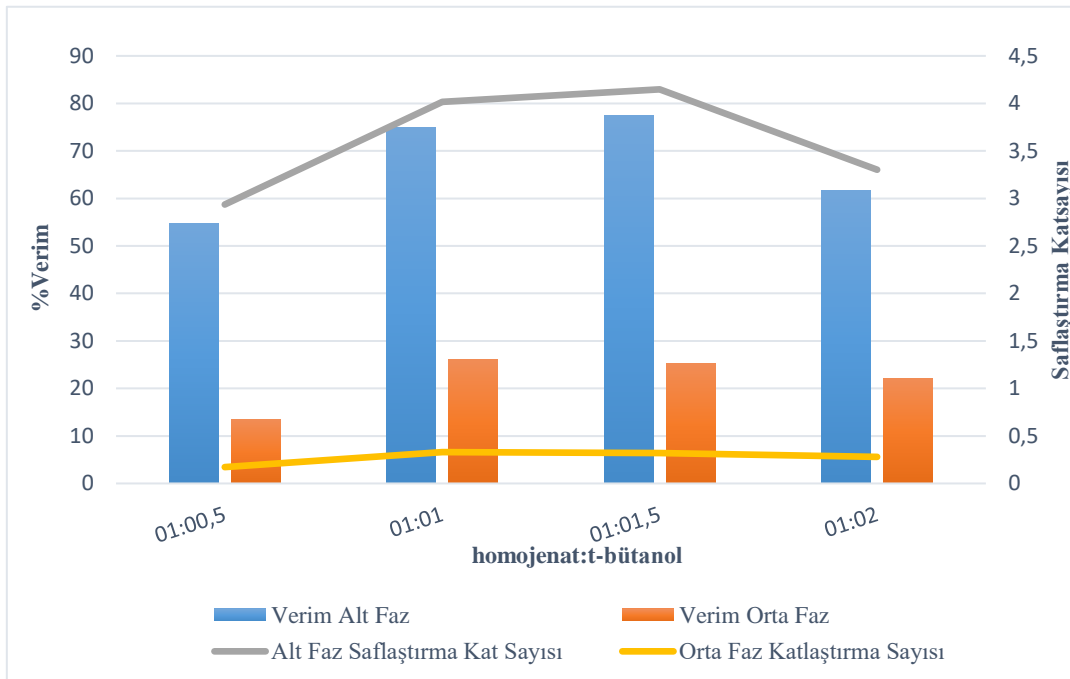
Şekil 3.8. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %60 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi.



Şekil 3.9. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %70 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi.



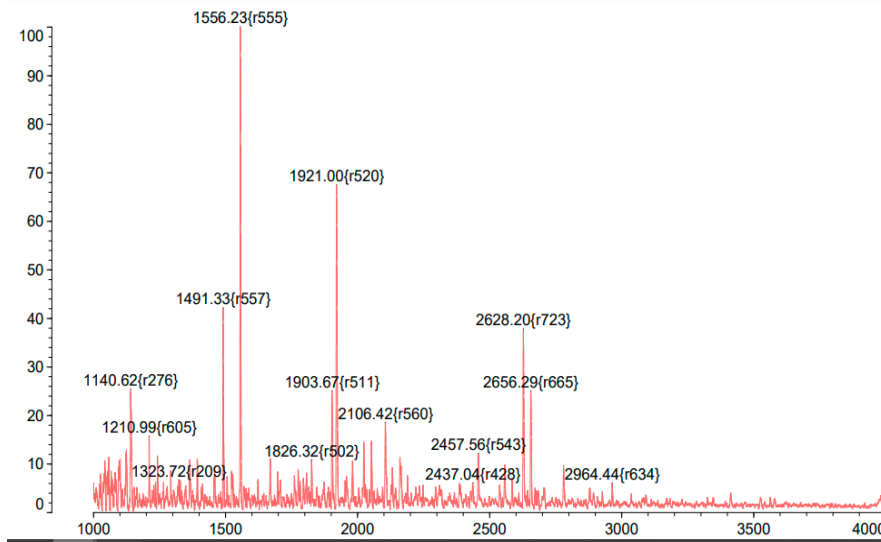
Şekil 3.10. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %80 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi.



Şekil 3.11. Proteaz enziminin saflaştırılmasında %90 amonyum sülfat konsantrasyonu ve çeşitli t-bütanol oranlarının verime ve saflaştırma katsayısına etkisi.

3.5.3.Moleküler ağırlığın belirlenmesi

Alt fazda saflaştırılan örneğin moleküler ağırlığı, MALDI-TOF cihazı kullanarak 15,56 kda olarak bulunmuştur.



Şekil 3.12. Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı.

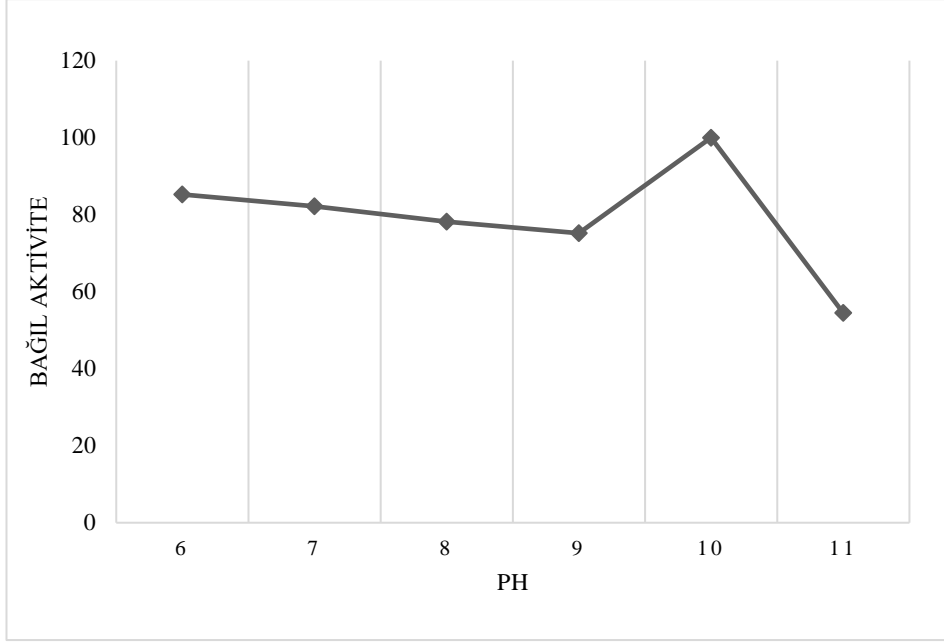
3.5.4.Proteaz enzimi üzerine optimum şartların incelenmesine yönelik sonuçlar

3.5.4.1.Proteaz enzimi için optimum pH tespitine dair sonuçlar

Saflaştırılan proteaz enzimi üzerinde optimum etkiyi gösteren pH değerini görmek için %0,65 kazein içeren içeren farklı pH değerlerinde tamponlar kullanılarak enzim aktivite değerlerine bakıldı. pH 6,0-8,0 değeri için 0,1 M sodyum fosfat, pH 7,0-9,0 değeri için Tris-HCl ve pH 9,0-11,0 değeri için glisin-NaOH kullanıldı. Proteaz enziminin pH 10 glisin-NaOH (pH 9,0-11,0) tamponunda en iyi aktiviteye sahip olduğu tespit edildi.

Tablo 3.5. Proteaz enzimi üzerine optimum pH değerinin tespiti için oluşturulan bağlı aktivite çizelgesi.

pH	6	7	8	9	10	11
Bağlı Aktivite(%)	85,23	82,15	78,15	75,21	100	54,46



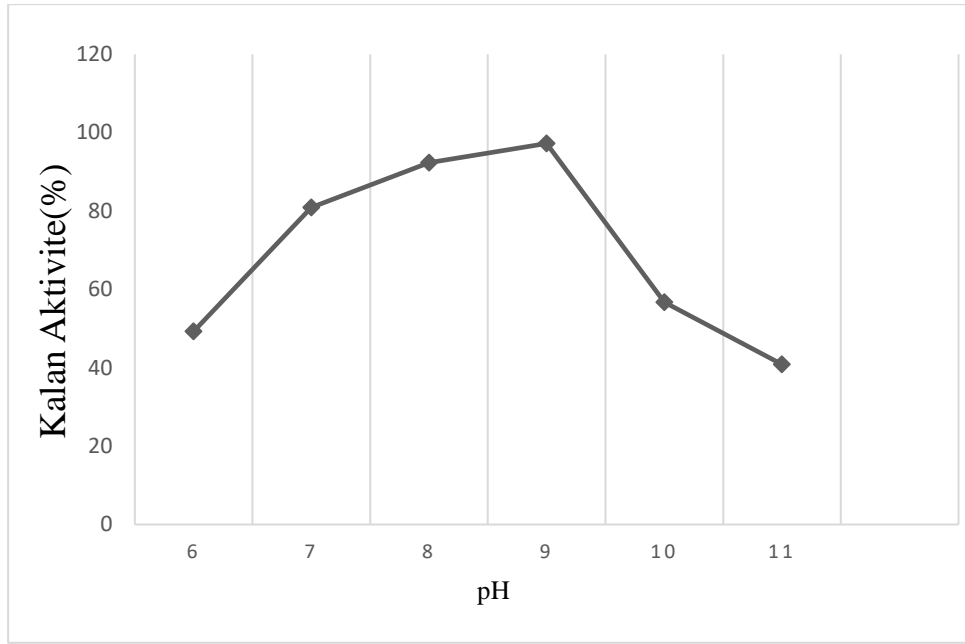
Şekil 3.13. Proteaz enzimi üzerine optimum pH değerinin tespiti için oluşturulan bağıl aktivite grafiği.

3.5.4.2. Proteaz enzimi üzerinde pH kararlılığının tespitine dair sonuçlar

Saflaştırılan proteaz enzimi üzerinde pH kararlılığının tespiti için bazı tamponlar kullanıldı. pH 6,0-8,0 değeri için 0,1 M sodyum fosfat, pH 7,0-9,0 değeri için Tris-HCl ve pH 9,0-11,0 değeri için glisin-NaOH kullanıldı ve aktivite değerlerine bakıldı. Proteaz enziminin pH 9 100 mM Tris-HCl tamponunda en iyi aktiviteye sahip olduğu tespit edildi.

Tablo 3.6. Proteaz enzimi üzerine stabil pH değerinin tespiti için oluşturulan bağıl aktivite çizelgesi.

pH	6	7	8	9	10	11
Kalan Aktivite (%)	49,26	80,94	92,36	97,25	56,71	40,87



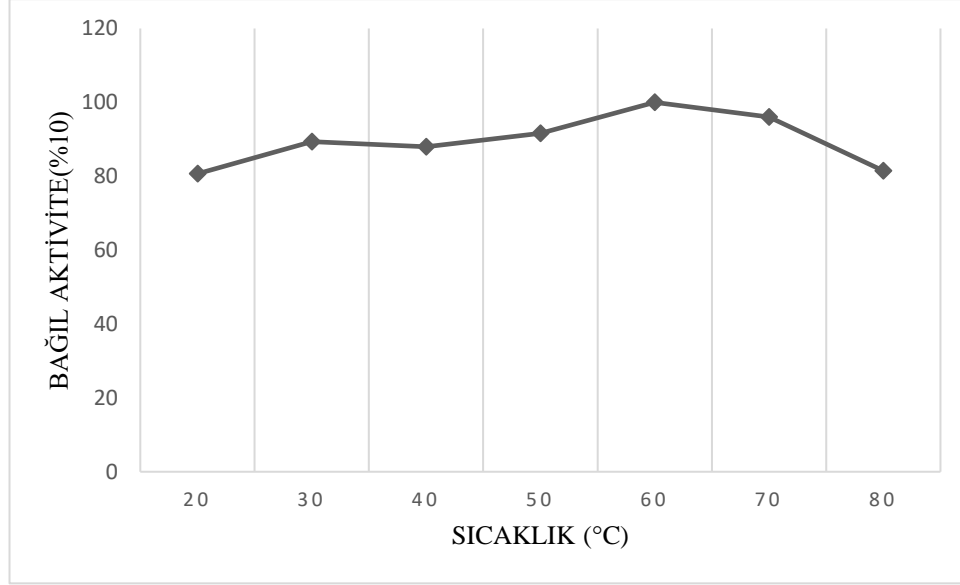
Şekil 3.14. Proteaz enzimi üzerine stabil pH değerinin tespiti için oluşturulan bağıl aktivite çizelgesi.

3.5.4.3. Proteaz enzimi üzerine optimum sıcaklığın etkisinin tespitine yönelik sonuçlar

Proteaz enzimi için optimum sıcaklığı belirlemek amacıyla 20°C ile 90° C arasındaki sıcaklık değerlerinde aktivite değerlerine bakıldı. Elde edilen veriler grafik ve çizelgelerde gösterildi. Bu sonuçlar ışığında optimum sıcaklığın 60°C olduğu belirlendi.

Tablo 3.7. Proteaz enzimi üzerine optimum sıcaklık tespiti için oluşturulan sıcaklık-bağıl aktivite (%) ölçüm sonuçları.

Sıcaklık	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
Bağıl Aktivite(%)	80,67	89,33	88,0	91,6	100	96,0	81,47	71,5



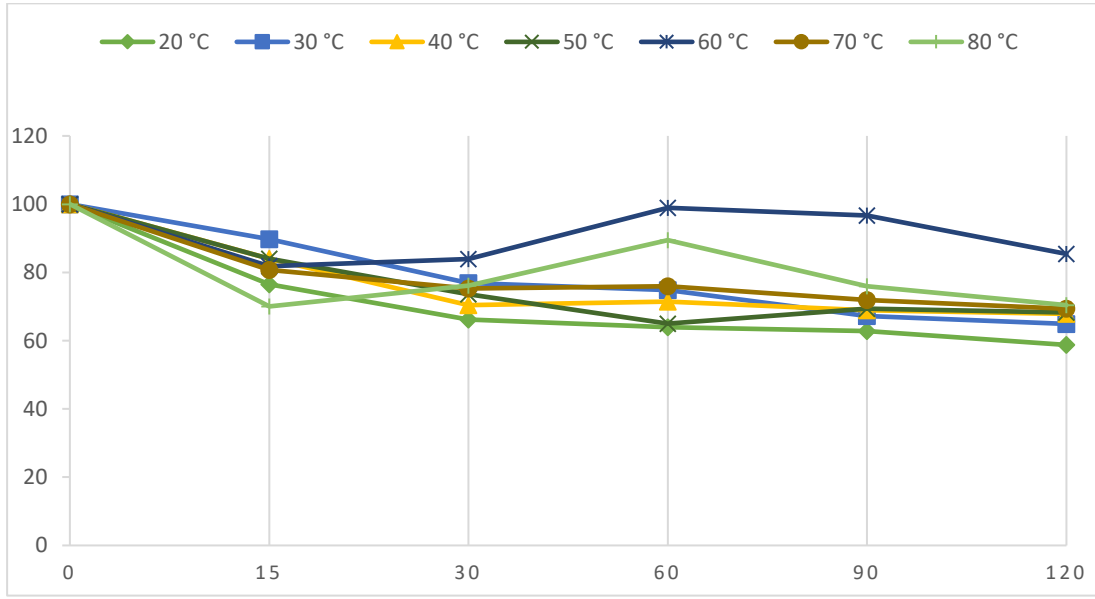
Şekil 3.15. Proteaz enzimi optimum sıcaklık tespiti için sıcaklık-bağıl aktivite (%) grafiği.

3.5.4.4. Proteaz enzimi üzerine stabil sıcaklığın etkisinin tespitine yönelik sonuçlar

Proteaz enziminin stabil sıcaklık değerinin tespiti için 20°C' ile 90°C sıcaklık aralığında ve 15, 30, 60 ve 90 dk'lık inkübasyon sürelerinde aktivite değerlerine bakıldı. Analizlerden elde edilen sonuçlar ile grafik ve çizelgeler oluşturuldu. Proteazın en iyi aktiviteyi 60°C sıcaklığında ve 60 dk süre sonunda %98,91'lik değer ile sağladığı görüldü. Diğer sıcaklık değerleriyle karşılaştırıldığında değişen sürelerde aktivitesini en iyi koruyan sıcaklık olduğu gözlemlendi. 20 °C, 30 °C ve 90 °C'de 120 dk inkübasyon süresinin sonunda gözle görülür bir aktivite kaybı tespit edildi.

Tablo 3.8. Proteaz enziminin stabil sıcaklığını tespit etmek için sıcaklık-zaman çizelgesi.

Süre (dk)	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
15	76,48	89,78	84,06	84,06	81,82	80,77	70,04	72,94
30	66,15	76,92	70,44	73,63	83,92	75,27	76,14	70,04
60	63,96	74,83	71,43	65,0	98,91	75,93	89,42	68,33
90	62,86	67,26	68,94	69,34	96,70	71,87	75,93	60,63
120	58,75	64,91	67,85	68,24	85,42	69,34	70,44	51,75



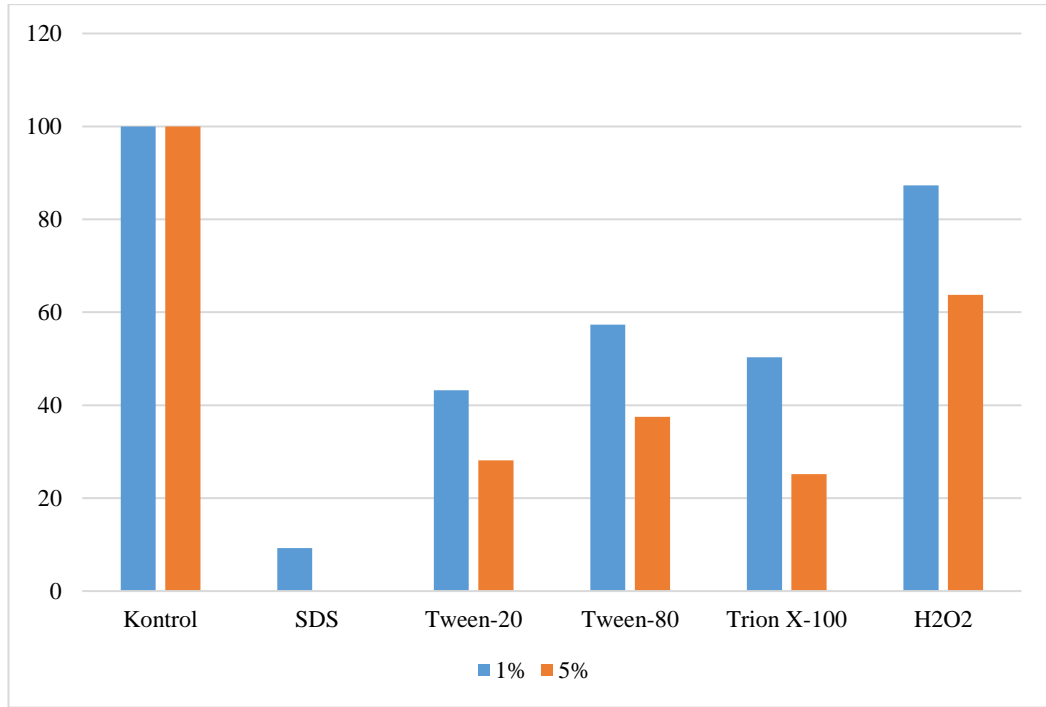
Şekil 3.16. Proteaz enzimi için stabil sıcaklık grafiği.

3.5.4.5. Proteaz enziminin aktivitesi üzerine okside edici ajanının ve yüzey aktif maddelerinin etkisinin incelenmesine yönelik sonuçlar

Saflaştırılan proteaz enzimi üzerine okside edici ajan olan H_2O_2 'nin ve yüzey aktif maddelerin etkisini incelemek amacıyla %1 ve %5' lik konsantrasyonlarda SDS, Tween-20, Tween-80, Trion X-100 gibi yüzey aktif maddeleri ve H_2O_2 (okside edici ajan) ile çözeltiler hazırlandı ve bu çözeltiler enzim ile 30 dk etkileşime sokularak aktivite tayini yapıldı. Sonuçlar incelendiğinde %1' lik SDS' in enzim aktivitesinde kayda değer bir aktivite kaybına neden olduğu gözlenirken %5'lik SDS'in enzimin aktivitesini tamamen inhibe ettiği tespit edildi. %1'lik H_2O_2 varlığında enzim aktivitesini %87'ye kadar koruduğu belirlendi. Sonuç olarak yüzey maddelerinin konsantrasyonu arttıkça enzimin aktivitesine olan etkisinin de arttığı belirlendi.

Tablo 3.9. Yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın proteaz enzimi üzerine etkisi.

Yüzey Aktif Maddeler	%1	%5
Kontrol	100	100
SDS	9,23	0
Tween-20	43,24	28,12
Tween-80	57,32	37,51
TritonX-100	50,32	25,17
H2O2	87,32	63,77



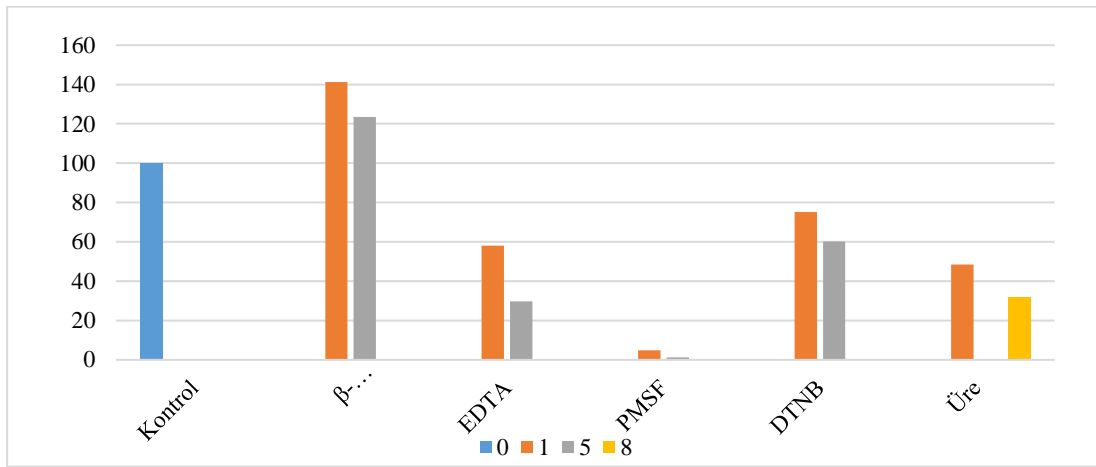
Şekil 3.17. Saflaştırılan proteaz enzimine yüzey aktif maddelerin etkisi.

3.5.4.6. İnhibitörlerin proteaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi

Proteaz enziminin inhibitörlere olan etkisini incelemek amacıyla DTNB, EDTA, PMSF ve β -merkaptotetanolden 1 mM ve 5 mM, üreden ise 1 mM ve 8 mM'lık çözeltiler hazırlandı ve enzim ile etkileşime sokularak 30 dk boyunca bekletildi ve süre sonunda aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon çözeltisi ile muamele edilmeyen enzim kontrol olarak kullanıldı ve 100 kabul edildi. Sonuçlar incelendiğinde enzimin %1 PMSF varlığında aktivitesinin yaklaşık %95'ini inhibe ettiği, %5' de ise neredeyse tamamını inhibe ettiği görülmektedir. İki konsantrasyondaki β -merkaptotanol varlığı aktivitede artışına neden olmuştur. Enzim aktivitesinde, EDTA varlığında da kayda değer bir azalma görülmesi enzimin metal bağlama bölgesine sahip olduğu sonucuna varılmayı sağlamıştır. Serin spesifik inhibitörü olan PMSF'nin enzimin üzerindeki inhibe etkisi aktif bölgesinde bir alkalın serin proteaz olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda incelemeye alınan alkalın serin proteaz enzimin dünyada çokça rağbet görmesi ve endüstride kullanım alanının geniş olması çalışmanın önemini göstermektedir.

Tablo 3.10.İnhibisyon çözeltilerinin proteaz aktivitesi üzerine etkisi.

İnhibisyon çözeltileri	Konsantrasyon(mM)	Kalan Aktivite (%)
Kontrol	0	100
B-merkaptolanol	1	141,32
	5	123,45
EDTA	1	58,12
	5	29,68
PMSF	1	4,85
	5	1,23
DTNB	1	75,11
	5	60,23
Üre	1	48,41
	8	31,57



Şekil 3.18. İnhibisyon çözeltilerinin proteaz aktivitesi üzerine etkisi.

3.5.4.7. Substratların proteaz enzimi üzerindeki etkisinin incelenmesi

Proteaz enziminin çeşitli substratlardaki aktivite değerlerini belirlemek amacıyla 100 mM pH 8,5 Tris-HCl tamponunda hazırlanan %0,65 konsantrasyondaki kazein, BSA, hemoglobin, jelatin ve azokazein substrat çözeltileri kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen değerler Çizelge 3.11’ de gösterildi. Proteaz enzimi en iyi kazein varlığında aktivite gösterdi. Kazeini sırasıyla azokazein hemoglobin, jelaitin ve en son olarak da BSA takip etti.

Tablo 3.11. Doğal substratların proteaz enzimi üzerine etkisi.

Doğal Substratlar (%0,65 w/v)	Kazein	Azokazein	Hemoglobin	Jelatin	BSA
Bağlı Aktivite (%)	100	83,62	47,27	35,38	21,15

4.TARTIŞMA

Enzim kaynağı olarak proteaz tercih edilmiştir çünkü proteaz enzimi genetik uygulamalarla yeni enzimlerin oluşmasını sağlamaktadır. Gıda endüstrisi, deri endüstrisi, evsel ve endüstriyel atıkların değerlendirilmesi, peptid sentezi, medikal alanlar, ipek işlenmesi, fotoğraf endüstrisi, deterjan endüstrisi gibi alanlarda uygulama imkanı bulunduğundan saflaştırma yöntemi olarak TPP tercih edilmiştir. Bunun nedeni olarak kromatografik yöntemlerden çok daha ucuz olması, birim operasyon sayısının azaltılması, bunların yanı sıra t-bütanolün pratik olarak oda sıcaklığında ve hatta yüksek sıcaklıkta kullanılabilir olması ve TPP'de elde edilen t-bütanol fazının kullanım tekrarının olması, daha hızlı, kısa süreli, ekonomik, etkili olması gibi avantajlardan kaynaklı olduğu söylenebilir [29].

Mikroorganizmaların gelişimi için en verimli üreme ortamının oluşturulması amacıyla organik çöplerden besiyeri elde edilmiştir ve çalışmamızda besiyerinde proteaz üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biri protein miktarıdır. Proteinler aminoasitlerin polimerleşmesi sonucu oluşan polimerlerdir ve her aminoasidin miktarı ve türü protein kaynağına göre farklılık gösterir. Örneğin hayvansal ve bitkisel proteinlerin de içerdikleri aminoasitler farklıdır ve farklılıklar proteaz çeşidini de etkiler. Proteazlar aktif bölgelerinde bulunan fonksiyonel aminoasite bağlı olarak serin proteaz, sistein proteaz, asidik proteaz ve metalloproteazlar olarak sınıflandırılmaktadır. Çalışmamızda hazırlanan besiyerinin bileşiminde bulunan bitkisel proteinlerden bakliyatlar, asidik asit, lizin, glutamik asit ve arjinin gibi aminoasitleri içerir. Hayvansal proteinler proteazın proteini parçalamak için kullandığı enzimlerden sistein ve serin dahil 20 aminoasidin tamamını içerir [33]. Sonuçlara bakıldığında bitkisel ve hayvansal proteinin eşit miktarda olduğu besiyeri proteaz üretimi için tercih edilmiştir fakat yine de enzim üretimi için hayvansal proteinler bitkisel proteinlere kıyasla aminoasit açısından daha zengin olduğu bilinmektedir. Hayvansal protein miktarının %70' lere çıkarıldığı durumda aktivitede artış meydana gelmiştir fakat eşit oranda elde edilen verim bu değerde sağlanamamıştır. %60-%40

oranı proteaz enzim aktivitesinde kayda değer bir düşüş yaşatmıştır. Bu nedenle bitkisel ya da hayvansal proteinlerden birine ağırlık vermektense dengeyi sağlamak daha mantıklı bir yaklaşım olacaktır. Literatürdeki protein farklılığı üzerine yapılan bir çalışmada Pinjar ve arkadaşları [34], pirinç çeşitlerinin farklı coğrafi bölgelerde yetiştirildiği için numunelerdeki protein seviyesinin oldukça farklı olduğunu söylemektedir. Çeşitli pirinç atığı örneklerinden ekstrakte edilen proteazların aktivitelerini karşılaştırmış ve farklı pirinç numunelerindeki proteaz üretim seviyesindeki farkın, numunelerin protein içeriğindeki farktan kaynaklandığını belirtmiştir.

Besiyerini etkileyen faktörlerden biri inkübasyon süresidir ve çalışmamızda optimum enzim oluşma süresinin 24 saat olduğu tespit edilmiş ve artan inkübasyon süresinde proteaz aktivitesinde azalma görülmüştür. Yapılan benzer çalışmalar incelendiğinde; Upgade ve arkadaşları [35], Fransız fasulyesi kullanarak gerçekleştirdiği fermentasyonda; Qazı ve arkadaşları [36] ise, buğday kepeği ve soya fasulyesinden proteaz üretimini, çalışmamızdan farklı olarak optimum enzim üretimini 48. saatte elde etmiştir ve bunun yanı sıra Shivkumar [37], yaptığı benzer çalışmada optimal inkübasyon süresinin 120. saatte 280 U/g enzim aktivitesi ile elde ettiğini belirtmiştir. Fakat tüm çalışmalar verimin artan inkübasyon süresinde düştüğü yönünde ortak bir karara varmıştır [34, 35]. Inkübasyon süresi arttıkça enzim üretiminin düşmesi ortamdaki diğer bileşiklerden ve kullanılan katı substrat yapısının zamanla bozulmasından kaynaklanmaktadır. Mikroorganizma tarafından kısa sürede enzim üretiminin gerçekleştirilmesi önemli avantaj sağlar. Optimum inkübasyon süresine yaklaştıkça doğrusal olarak enzim üretimi artar fakat üremenin en yoğun olduğu zamandan sonra kademeli bir şekilde azalır. Bunun nedeni, fermentasyon ortamında bulunan besinlerin azalması, bozulması ve ortamdaki atık maddelerin birikmesi sonucu bakterilerin ölüm fazına geçişinin hızlandırması ve ölüm fazında üretimin durağan fazdan daha düşük olması gösterilebilir [37].

Çalışmamızda organik çöplerden elde edilen besiyerinde enzim üretimi için optimum pH 5,5 olarak bulunmuştur ve daha yüksek ya da daha düşük pH değerleri aktivitenin azalmasına sebep olmuştur. Literatürdeki enzim üretiminde pH' ın etkisi incelenmek istendiğinde; Oyeleke ve arkadaşları [38], bitkisel proteinlerden fasulyeyi kullanarak hazırladıkları besiyerinde *A.niger*' den proteaz üretimi için optimum pH'ın 6 olduğunu belirtirken; Shivkumar [37], *Aspergillus sp.* tarafından asit proteaz üretimi için

optimum pH 'ın 5.0 olduğunu ve 5.0' ın altındaki ve üzerindeki pH' ın enzim üretimini olumsuz etkilediğini belirtmiştir. Benzer şekilde Oyewole ve arkadaşları [39], mezhaba atıklarından elde ettikleri proteaz enzim aktivitesi için sırasıyla *A. niger* ve *P. frequesans* için 5.0 ve 6.0 pH 'ın optimum olduğunu kaydetmiştir. Ortamın pH' ı, organizmanın büyümesini ve metabolizmasını etkileyen önemli bir parametredir. Organizmaların çoğu, optimum büyümeleri için pH' ın 5 ila 8 arasında olmasını tercih eder. Bununla birlikte, çok azı asidik pH'ı tercih ederken, çok azı salgı ürünlerine dayalı bazik pH' ı tercih eder [40].

Bu parametrelerle üretilen besiyerinde proteaz aktivitesi 60,79 U/ml olarak hesaplanmıştır. Literatürdeki benzer çalışmalara bakıldığında Paranthaman ve arkadaşları [41], *A.niger* bakterisi kullanarak pirinç atıklarından proteaz enzimi üretiminde aktiviteyi 67,7 U/g bulurken, Devi ve arkadaşları da [42], *A. niger* küfü ile yaptıkları optimizasyon çalışmalarında proteaz aktivitesini 89,1 U/ml olarak belirtmişlerdir. Çalışmamızdan elde edilen değer ile yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda proteaz üretimi için en uygun besiyeri tespit edildikten sonra kompozisyonuna bakılmıştır. Organik atıklardan elde edilen sıvı besiyerinde rutubet miktarı %97,96 olarak bulunmuştur. Organik atıklardan besiyeri elde eden Atıcı ve arkadaşlarının [43] çalışması ile karşılaştırılmak istendiğinde, yumurta kabuklarından hazırladığı besiyerinde rutubet değeri %99,5 olarak bulunmuştur. Çalışmamızdaki besiyerinin protein oranı 0,6 g/100 g olarak tespit edilmiştir. Atıcı, yumurta kabuklarında protein değerini 3,9 g/100 g bulurken, salatalıktan hazırladığı besiyerinde protein oranını 0,37 olarak tespit etmiştir. Yumurta hayvansal kaynaklı güçlü bir protein kaynağı olduğu için değer daha yüksek çıkmıştır. Besiyerimizde toplam şeker 3,61 g/100 bulunmuştur. Diğer çalışmada ise bu değer 0,73 g/100 olarak bildirilmiştir. Besiyerimizde yağ oranı 0,26 g/100 g olarak hesaplanmıştır. Atıcı besiyerlerinde sırasıyla bu değerleri benzer şekilde 0,32 g/100 g ve 0,3 g/100 g olarak tespit etmiştir. Polisakkarit oranımız çalışmamızda 0,81 g/100 g iken Atıcı'nın yumurta kabuklarıyla yaptığı çalışmasında bu değer 2,75 g/100 g'dır. Son olarak kül tayininin sonuçları çalışmamızda % 0,41 olarak hesaplanmıştır. Besiyerimizin kompozisyonu incelendiğinde ve besiyerinde üreyebilen *A.niger*, saflaştırılan proteaz enzimi göz önüne alındığında, besiyerinin mikroorganizmaların gelişimini destekleyen besin değerlerini yeterli miktarda içerdiği görülmektedir. *A.niger*' den

saflaştırılan proteaz enzimi %80 (w/v) amonyum sülfat oranına ve 1,0:1,15 (v/v) homojenat:t-bütanol oranında % 235,172 verimle, 13,15 kat alt fazda elde edilmiştir.

Literatürdeki saflaştırma çalışmalarında çoğunlukla çok aşamalı kromatografik yöntemler tercih edilir fakat TPP yöntemiyle saflaştırmaya ait az sayıda çalışma vardır. TPP yöntemi kullanılarak yapılan saflaştırmalarda genellikle %25-363 arası verim ve 2,7-95 arası saflaştırma katsayısına ait sonuçların bildirildiği gözlenmiştir [10]. Calotropis procera ve Cucumis melo (Cucumis) 'nun TPP yöntemiyle proteaz saflaştırması üzerine yapmış olduğu çalışmalarda %60-65 amonyum sülfat konsantrasyonunda yüksek oranda enzim geri kazanımı ve saflaştırma tespit edilirken, t-bütanol hacmindeki artışın, enzim aktivitesinde bir azalmaya sebep olduğu belirtilmiştir [13]. Pinjara ve arkadaşları [34], *A.niger* ve *A.flavus* proteazlarını %70 doygunlukta amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz ile sırasıyla 11 ve 9 kat saflaştırmıştır. Chimbekujwo ve arkadaşları [44], *A. brasiliensis* BCW2 tarafından üretilen ham proteazı, amonyum sülfat (%80) kullanılarak kısmen saflaştırılmış ve %28 proteaz geri kazanımı ile 13,3 kat saflık vermiştir. Rüzgar' ın [10], *B. licheniformis* OSB6'dan proteaz enzimlerinin TPP ile saflaştırılması üzerine yaptığı çalışmada %70 amonyum sülfat ve 1,0:1,5 t-bütanol oranıyla saflaştırmayı gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ipek otundan proteaz enzimini saflaştırmak için ilk olarak 1,0:0,5 homojenat-t:bütanol oranında %65 amonyum sülfat ile ikinci bir TPP yapılmıştır. Analiz sonucunda enzimin %132 verim ve 6,92 kat saflaştırıldığı ve enzimin alt fazdan elde edildiği tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada balık iç organlarında alkalın proteazı saflaştırmak amacıyla 1,0:0,5 oranında t-bütanol, %50 amonyum sülfat kullanılarak kullanılarak pH 8,0' de TPP yöntemi uygulanmış ve enzimin % 154 verimle saflaştırıldığı bildirilmiştir. Sonuç olarak t-bütanol miktarı daha düşük olduğunda amonyum sülfat ile yeterli sinerji oluşturamaz ama daha yüksek ise protein denatürasyonuna neden olması kaçınılmazdır. Ayrıca yapılan çalışmalarda TPP prosedürleri sırasında amonyum sülfat konsantrasyonundaki artışın enzimlerin aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir [10].

Saflaştırma işleminin etkinliğini ölçmek amacı ile saflaştırılan proteazın moleküler ağırlığı hesaplanmıştır ve analiz sonucunda değer 15,56 kDa olarak bulunmuştur. Aktif bölgelerinde bir serin grubu bulunan serin proteazların genellikle moleküler kütleleri 15-35 kDa arasında değişmektedir. Genele bakıldığında 30-35 kDa arasında bir yoğunlaşma olduğu görülmektedir fakat daha yüksek moleküler ağırlığa sahip

enzimlerinde olduğu bazı çalışmalarda belirtilmiştir [45]. Örneğin Charles ve arkadaşları *A.nidulans* 'tan saflaştırdıkları alkalın proteazın moleküler ağırlığının 42 kDa olduğunu belirtmiştir [46]. Shehada [45], *A.niger* 2 şuslarında üretilen proteazın moleküler ağırlığını 33 kDa olarak bulurken bu değere çok yakın bir değer Ferid ve arkadaşlarının [47], *A. niger* 'den proteaz ürettiği çalışmada 32 kDa olarak belirlenmiştir. Benzer şakilde Hajji ve arkadaşları [48], *A.clavatus* ES1' den ürettikleri stabil alkalın serin proteazın moleküler ağırlığını 32 kDa olarak bulurken yakın bir değer de 37 kDa olarak Chakrabarti ve arkadaşlarının [49] *A. terreus*'tan elde ettiği ekstrasellüler alkalın proteazdan gelmiştir. Bir başka çalışmada da aynı şekilde Devi ve arkadaşları [42], *A.niger*' den alkalın proteaz enziminin moleküler ağırlığını 38 kDa olarak tespit etmiştir. Çalışmamızda bulunan molekül ağırlığı proteaz üzerine yapılan çalışmalardan farklı olarak daha düşük çıkmıştır. Bunun sebebi çalışmada tercih edilen saflaştırma yöntemi ve kullanılan besiyeri gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilir.

Enzimin fiziksel özellikleri ve fonksiyonları için saflaştırma ve karakterizasyon önemli bir aşamadır. Bu nedenle saflaştırılan proteazın karakteristik özelliklerini tespit etmek amacıyla eşili sıcaklık ve pH değerlerinde aktivitelere bakılmıştır. *A. niger* bakterisinden saflaştırılan proteaz enzimi için optimum pH değerleri 10 olarak tespit edilmiş ve 6-7 arasında da % 85' e kadar aktivitesini koruduğu, 2 saatlik inkübasyondan sonra en yüksek aktiviteyi pH 9,0'da verdiği gözlenmiştir. Literatürdeki benzer çalışmalara bakıldığında Devi ve arkadaşları'nın [42], *A. niger* ile yaptıkları optimizasyon çalışmalarında ve benzer şekilde Lanka ve arkadaşları 'nın [50], süt ürünleri atık suyunda alkalın proteaz üretiminde de optimum pH' ın 10,0 olduğu bulunmuştur. Farklı şekilde Coral ve arkadaşları'nın [51] yanı sıra Oyeleke ve arkadaşları da [25], *A. niger* 'den proteaz aktivitesi için optimum pH' ın 9,0 olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmaların aksine Olajuyıgbe [52], *A.niger*'den asit proteaz üretiminde pH kararlılığının pH 3,5' te en iyi olduğunu ve 4,0 'dan sonra hızla düştüğünü belirtmiştir fakat *A.niger* ile yapılan çalışmaların çoğunda optimum pH 10,0 olarak bulunmuştur. alışmalar karşılaştırıldığında elde edilen enzimin pH kararlılığının oldukça iyi olduğu ve literatürdeki çalışmalar ile uyumlu olduğu grlmştir. Bununla birlikte, optimum pH değerinin 10 olarak bulunması, enzimin alkali şartlarda dahi aktif kalabildiğini göstermektedir.

A.niger küfünden saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık çalışmaları sonucunda proteazın en iyi aktiviteyi 60 °C' de 60 dk' lık inkübasyon süresi sonunda %98,91'lik değer ile sağladığı görülmüş ve diğer sıcaklık değerleriyle karşılaştırıldığında değişen sürelerde aktivitesini en iyi koruyan sıcaklık olduğu gözlenmiştir. Qazı ve arkadaşlarının [36] yaptıkları benzer bir çalışmada da buğday kepeği ve soya fasulyesini kullanarak *A. niger*' den proteaz üretimi için optimum sıcaklığın 60 °C olduğunu buldukları gibi başka çalışmalarda yine *A. niger* kullanılarak üretilen proteazın 40 ile 50°C'de optimum aktivite sergilediği gösterilmiştir. Literatürde çoğunlukla sıcaklık ve inkübasyon süresi arttıkça aktivitenin düştüğü görülür fakat termofilik enzimlerin genellikle sıcaklık sonucu aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Endüstriyel çalışmalarda sıcaklığa dayanıklılık ve yüksek alkalilik olması istenen bir durumdur ve enzimin tercih edilme sebepleri arasında yer alır. Biyoteknolojik uygulamalar ve biyomühendislik alanlarında da yüksek pH ve yüksek sıcaklık aralığında aktivitesini ve stabilitesini yüksek tutan proteazlar ve daha fazla kullanılır. Dolayısıyla bu yönüyle *A.niger*' den üretilen proteaz enziminin oldukça avantajlı olduğu söylenebilir [10] .

A.niger küfünden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi inhibitörlerin nasıl etkilediğinin incelenmesi amacıyla, süfidril grubu inhibitörü olan β -merkaptoetanol; serin spesifik inhibitörü olan PMSF; sistein spesifik inhibitörü olan DTNB, EDTA ve üre kullanıldı. Bir proteaz sınıfına özgü inhibitörler tarafından enzim aktivitesinin inhibisyonu, bilinmeyen saflaştırılmış proteazın mekanik sınıfını belirlemek için uygundur. Elde edilen veriler neticesinde %1 PMSF varlığında aktivitesinin yaklaşık %95' ini inhibe ettiği, %5 konsantrasyonda ise neredeyse tamamını inhibe ettiği görülmektedir. Serin spesifik inhibitörü olan PMSF' nin enzimin üzerindeki inhibe etkisi aktif bölgesinde bir serin proteaz olduğunu ve enzimin alkalın serin proteaz olduğunu göstermektedir. PMSF' nin aksine iki konsantrasyondaki β -merkaptoetanol varlığı da aktivitede artışa neden olmuştur. Sistein proteaz inhibitörü olan DNTB' nin ise 1 mM' lık konsantrasyonlarda enzim aktivitesini %60' ını, 5 mM' lık konsantrasyonlarda ise %48' ini koruduğu belirlendi. EDTA 1 mM ve 5 mM'lık konsantrasyonlarında enzim aktivitesini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Enzim aktivitesinin EDTA varlığında da azalması enzimin metal bağlama bölgesine sahip olduğunu göstermektedir. Benzer karakterizasyon çalışmalarında, *A.niger* tarafından üretilen proteazın EDTA varlığında %90 inhibe olduğu ve fenilmetilsülfonil florür

(PMSF) tarafından aktif bölgedeki temel serin kalıntısının ve aktivitenin tamamen kaybolmasına neden olduğu görülmüştür [42,53].

Saflaştırılan proteaz enzimi üzerine okside edici ajan olan H₂O₂ 'nin ve yüzey aktif maddelerin etkisi incelenmesi için %1 ve %5' lik konsantrasyonlarda Tween 80, Tween 20, Trion X-100, H₂O₂ ve SDS kullanıldı. Analizler neticesinde %1' lik Tween-20, Tween-80 ve Trion X-100 varlığında enzim aktivitesinin sırasıyla %43, %57 ve %50 oranında koruduğunu tespit edildi. %5' lik Tween-20 varlığında ise enzim aktivitesinin %28'e düştüğü ve Tween-80, Trion X-100 varlığında sırasıyla %37 ve %25 oranına düştüğü belirlendi. %1 ve %5 oranlarında H₂O₂ varlığında ise enzim aktivitesinin sırasıyla %87 ve %68 oranlarında önemli ölçüde koruduğu belirlendi. Genel olarak yüzey aktif maddelerinde %5'lik konsantrasyonlarda, %1'lik konsantrasyonlara oranla daha fazla aktivite kaybı gözlemlendi. %1' lik SDS varlığı ise enzim aktivitesinde ciddi bir aktivite kaybına neden olurken, %5' lik SDS' in enzimin aktivitesini tamamen inhibe ettiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak kullanılan yüzey maddelerinin konsantrasyonu arttıkça enzimin aktivitesine olan etkisinin de arttığı belirlenmiştir. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında; Sattar ve arkadaşları [54], *A. niger* kaynaklı proteaz aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerin, metal iyonlarının ve çözücülerin etkisini incelediği çalışmada 30 dakikalık inkübasyon sonrasında Tween 80 ve Trion X-100' ün yaklaşık %25 inhibisyona sebep olduğu, SDS varlığında enzimin %50 oranında aktivitesini kaybettiğini bildirmiştir. Benzer şekilde Pham ve arkadaşları [32], *A. niger* VTCC-F021' den ürettikleri proteaz aktivitesinin %0,5-%2 (w/v) konsantrasyonlarda Tween-20 ve Tween-80 'e karşı yüksek direnç gösterdiğini ve başlangıç aktivitesinin %80'inden fazlasını koruduğunu tespit etmiştir. SDS ve Triton X-100 ise enzim aktivitesini üçte iki oranında azaltmıştır.

A.niger'den saflaştırılan proteaz enziminin farklı substratlardaki aktivite miktarının incelenmesini adına %0,65 (w/v) konsantrasyonda kazein, azokazein, jelatin, BSA ve hemoglobinden oluşan protein substratları kullanıldı. Enzimin en iyi kazein varlığında aktivite gösterdiği ve kazeini sırasıyla azokazein (%83), hemoglobin (%47), jelaitin (%35) ve en son olarak da BSA (%21)' nın takip ettiği görülmektedir. Muazu'nun [55], *A. niger* üzerine yaptığı çalışmasında da kazeinin substrat olarak etkisi çalışılmış ve 0.44 µg/ml ile en yüksek proteaz aktivitesi kazeinde elde edilmiştir. Benzer olarak Leng ve arkadaşları [56], *A. oryzae* CH93'den saflaştırılan proteaz enziminin BSA, jelatin, kazein ve azokazein substratları varlığında aktivitesi incelendiğinde kazeinin en

iyi aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir. Çeşitli substratlara enzimin ilgisinin olması kullanım alanlarının genişlemesine olanak sağlar. Bu nedenle bazı belli koşullar altında stabil kalabilen enzimler, stabilitenin moleküler temelini atmak adına bir sistem oluşturur ve bu durum endüstriyel uygulamalar için proteazların tasarlanmasına öncülük edebilir.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyoteknolojinin endüstriyel enzimler hakkında yaptığı araştırmalar giderek önem kazanmaktadır. Bunun nedeni olarak enzim teknolojisinin gün geçtikçe gelişmesi, genişleyen ürün kullanım alanları ve ekonomik değerinin çok yüksek olması gösterilebilir. Bu çalışmaların bir kısmı atıklardan enzim üretimi üzerinedir. Günümüz dünyasında, nüfus her geçen gün artmaktadır ve bu nedenle artan atık oluşumu gerçeğini düşünmek ve gerekli aksiyonu almak kaçınılmazdır. Özellikle meyve ve sebzelerin doğasında bulunan biyolojik olarak parçalanabilir özelliklerinden dolayı, bunlardan elde edilen atık miktarı Dünya çapında yılda yaklaşık 50 tonu bulmaktadır ve bunun sadece %0,5'i çeşitli işlemler için girdi olarak tahsis edilir, geri kalanı ise çöpe atılır. Bu nedenle günümüzde herhangi bir sürecin yan ürünü olarak bol miktarda bulunan atıklardan kaynakların yenilenmesine odaklanılmıştır [33]. Bu amaçla pek çok çalışma yapılmıştır. Madhumithah ve arkadaşları [24], yerel pazardan temin edilen patates, balkabağı, karnabahar, lahana ve brinjal gibi bitkisel atıkları; Oyeleke ve arkadaşları [25], bitkisel protein olan bakliyat atıklarını; Lanka ve arkadaşları [50], ise hayvansal protein olan süt ürünleri atıklarını kullanarak *A.niger*' den proteaz üretimini amaçlamıştır.

Mevcut çalışmanın sonuçları açıkça göstermektedir ki ucuz substrat olan organik atıklar proteaz üretimi için potansiyel kaynak olarak kullanılabilir. Proteazlar küresel sanayi üretiminin %60'ından fazlasını oluşturmaktadır ve bu nedenle enzim pazarı açısından bu çalışma önem kazanmaktadır çünkü reaksiyonları hızlandıran yeni alkaline proteazları üreten, olumsuz koşullara dayanıklılığı yüksek olan mikroorganizmaların izolasyonu da önem arz etmektedir. Ayrıca hızla gelişen sanayileşme, dünyaya ürünler için çok yıllık bir hammadde ihtiyacı sunmaktadır. Bununla ilgili olarak, oluşan atık gereksinimleri karşılanabilirse, üretim maliyetinde önemli ölçüde azalma sağlanabilmektedir. Çalışmamız atıkların değerlendirilmesi ve endüstrideki enzim açığını kapatmak adına önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızda proteazın kolay, hızlı ve düşük maliyetli şekilde üretimi için elzem parametreler optimize edilmiştir [33].

Endüstride enzimlerin ve rekombinant proteinlerin üretimi için düşük maliyetli ve saflaştırmada beklenen sonucu verebilen teknolojilerin gelişmesine ihtiyaç vardır. Bu nedenle bilim insanları kendine daha ekonomik olan protein saflaştırma yöntemi geliştirmeyi görev edinmiştir. TPP yöntemi diğer yöntemlerle kıyaslandığında harcanan amonyum sülfat miktarı çok daha düşük olduğu ve geri kazanımı da mümkün olduğu maliyet açısından elverişlidir. Optimal sıcaklık ve pH gibi deneysel çalışmaları kolaylaştırması da uygulamanın bir avantajıdır [30].

KAYNAKLAR

- [1] Gurung, N., Ray, S., Bose, S., Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine and beyond. *Biomed Research International*. doi: 10.1155/2013/329121.
- [2] Ha, C. E, Bhagavan, N.V. (2011). Essentials of medical biochemistry: with clinical cases. *Academic Press*. 145 (4), 576–577. doi: 10.4103/0971-5916.213764.
- [3] Negi, S., Banerjee, R. (2009). Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. *Food Research International*, 42(4), 443-448. doi: 10.1016/j.foodres.2009.01.004.
- [4] Uyanık, A. (2008). Beta - Galaktosidaz enziminin mikrobiyal hücrelerden izolasyonu ve karakterizasyonu. [Yüksek Lisan tezi]. Ankara Üniversitesi.
- [5] Sundarram, A., Murthy, T. P. K. (2014). α -amylase production and applications: a review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2 (4), 166-175. doi: 10.12691/jaem-2-4-10.
- [6] Gupta, R., Beg, Q., Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (1), 15-32. doi: 10.1007/s00253-002-0975-y.
- [7] Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6 (2), 174. doi: 10.1007/s13205-016-0485-8.
- [8] Mane, P., Tale, V. (2015). Overview of microbial therapeutic enzymes. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 4 (4), 17-26. ISSN: 2319-7706.
- [9] Bhat, M. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18 (5), 355-383. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00041-0).
- [10] Rüzgar, D. (2019). *Bacillus Licheniformis* Osbs6'dan amilaz ve proteaz enzimlerinin üçlü faz ayırma sistemi (TPP) ile saflaştırılması ve karakterizasyonu. [Yüksek Lisan tezi]. Ankara Üniversitesi.
- [11] Duman, R. (2016). Üçlü faz ayırımı (ÜFA) ile geleneksel enzim saflaştırma tekniğinin karşılaştırılması; ÜFA ile saflaştırılan β -galaktosidazın termodinamik özellikleri. *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6 (3), 107-117. doi: 10.21597/jist.2016321845.

- [12] Saxena, L., KIyer, L., Ananthanarayan, L. (2007). Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/protease inhibitor. *Process Biochemistry*, 43 (3), 491-495. doi:10.1016/j.procbio.2006.09.016.
- [13] Gagaoua, M. (2014). Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. *Separation and Purification Technology* , 132 (2), 461-467. doi: 10.1016/j.seppur.2014.05.050.
- [14] Goyal, N., Gupta, J., Soni, S. (2005). A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus sp.* I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology*, 37 (7), 723-732. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.04.017.
- [15] Zhang, C., Xing, X. H., Liu, M. S. (2004). Production of multienzymes consisting of alkaline amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in the saccharification of sweet potato. *Biochemical Engineering Journal*, 19 (2), 181-187. doi: 10.1016/j.bej.2004.01.001.
- [16] Prakash, O., Jaiswal, N. (2010). α -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 160 (8), 2401-2414. doi: 10.1007/s12010-009-8735-4.
- [17] Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 62 (3), 597-635. doi: 10.1128/mmbr.62.3.597-635.1998.
- [18] Souza, P. M., Bittencourt, M. L. A., Caprara, C. C., Freitas, M., Almeida, R. P. C.A., Silveira, D., Magalhães, P. O., Fonseca, Y.M., Junior, A.P. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 46 (2), 337-346. doi: 10.1590/S1517-838246220140359.
- [19] Zambare, V., Nilegaonkar, S., Kanekar, P. (2011). A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. *New Biotechnology*, 28 (2), 173-181. doi: 10.1016/j.nbt.2010.10.002.
- [20] Sabotič, J., Kos, J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors current and potential applications. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 93 (4), 1351-1375. doi: 10.1007/s00253-011-3834-x.
- [21] Banerjee, G., Ray, A. K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology And Genetic Engineering Reviews*, 33 (2), 119-143. doi: 10.1080/02648725.2017.1408256.
- [22] Verma, A., Singh, H., Chattopadhyay, A., Tiwari, K.K., Kaur, S., Dhilon, G. S. (2017). Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. *Critical Reviews In Biotechnology*, 37 (4), 476-491. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1185388>.

- [23] Kumaran, E., Mahalakshmi, A., Rajan, S. (2013). Effect of fish waste based *Bacillus* protease in silver recovery from waste X-ray films. *Int. J. Curr. Microb. Appl. Sci*, 2 (3), 49-46. <https://doi.org/10.11594/jtls.11.01.08>.
- [24] Madhumithah, C. G., Krithiga, R., Sundaram, S., Sasikumar, C. (2011). Utilization of vegetable wastes for production of protease by solid state fermentation using *Aspergillus niger*. *World Journal of Agricultural Sciences*, 7n(5), 550-555. ISSN 1817-3047.
- [25] Oyeleke, S., Oyewole, O., Egwim, E. (2011). Production of protease and amylase from *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* using parkia biglobosa (africa locust beans) as substrate in solid state fermentation. *Advances in Life Sciences*, 1(2), 49-53. doi:10.5923/j.als.20110102.09.
- [26] Kazan, D., Denizci, A., Kerimak, Ö. M., Eraslan, A. (2005). Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE-42. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32, 335-344. doi: 10.1007/s10295-005-0260-z.
- [27] Gagaoua, M., Equipe, K. (2016). Three phase partitioning system, an emerging non-chromatographic tool for proteolytic enzymes recovery and purification. *Biosensors Journal*, 1 (1-4), 5. doi: 10.4172/2090-4967.1000134.
- [28] Yan, J.K., Wang, Y.Y., Qiu, W.Y., Ma, H., Wang, Z.B., Wu, J.Y. (2017). Three-phase partitioning as an elegant and versatile platform applied to nonchromatographic bioseparation processes. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 58 (14), 2416-2431. doi: 10.1080/10408398.2017.1327418.
- [29] Dennison, C., Lovrien, R. (1997). Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expression And Purification*, 11 (2), 149-161. <https://doi.org/10.1006/prep.1997.0779>.
- [30] Kat, B. (2013). İnvertzaz enziminin üçlü faz sistemi ile saflaştırılması ve demir-tanin kompoziti üzerine immobilizasyonu. [Yüksek Lisan tezi]. Sakarya Üniversitesi.
- [31] Uçurum, M., Serencam, H. (2019). Taguchi deney tasarımı kullanılarak uçucu kül ile Ni (II) gideriminde bazı adsorpsiyon parametrelerinin etkinliğinin irdelenmesi. *Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8 (1), 336-344. <https://doi.org/10.28948/ngumuh.517135>.
- [32] Pham, T. H., Quyen, D., Nghiem, N. M. (2012). Purification and properties of an endoglucanase from *Aspergillus niger* VTCC-F021. *Turkish Journal of Biology*, 36 (6), 694-699. <https://doi.org/10.3906/biy-1202-30>.
- [33] Çetiner, M., Bilek, S. (2018). Protein kaynakları. *Çukurova Tarım Gıda Bilim Dergisi*, 33 (2), 111-126. <https://orcid.org/0000-0003-0475-4099>.
- [34] Pinjar, S., Ca, S., Bhavimania, S., Anupama, S., Ba, S., Inamdara, S. R. (2013). Production and partial characterization of protease from *Aspergillus flavus* using rice mill waste as a substrate and its comparison with *Aspergillus niger* protease. *International Journal of Current Engineering and Technology*, 4 (4) 143-147. <http://dx.doi.org/10.4236/aer.2016.44012>.

- [35] Nandeshwar, A., Upgade, A., Samant, L. (2011). Assessment of fungal protease enzyme from French bean using *Aspergillus niger* by solid state fermentation. *J. Microbiol. Biotech. Res*, 1(4), 45-51. www.scholarsresearchlibrary.com.
- [36] Qazi, J. I., Jamshaid, H., Nadeem, M., Ali, S. (2008). Production of proteases by *Aspergillus niger*, through solid state fermentation. *Punjab Univ. J. Zool*, 23 (1-2), 37-46.
- [37] Shivakumar, S. (2012). Production and characterization of an acid Protease from a local *Aspergillus sp.* by solid substrate fermentation. *Archives of Applied Science Research*, 4 (1), 188-199. (<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>).
- [38] Oyeleke, S. B., Oyewole, O., Egwim, E. (2011). Production of protease and amylase from bacillus subtilis and *Aspergillus niger* using parkia biglobossa (africa locust beans) as substrate in solid state fermentation. *Advances in Life Sciences*, 1(2). doi: 10.5923/j.als.20110102.09.
- [39] Oyewole, O. A., Oyeleke, S., Dauda, B., Emiade, S. (2011). Production of amylase and protease enzymes by *Aspergillus niger* and *Penicillium frequestans* isolated from abattoir effluent. *Microbiology Journal*, 1 (5), 174-180. doi: 10.3923/mj.2011.174.180.
- [40] Prakash, O., Jaiswal, N. (2010). α -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160 (8), 2401-2414. doi: 10.1007/s12010-009-8735-4.
- [41] Paranthaman, R., Alagusundaram, K., Indhumathi, J. (2009). Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World J. Agricultural Sci*, 5 (3), 308-312. [http://www.idosi.org/wjas/wjas5\(3\)/7.pdf](http://www.idosi.org/wjas/wjas5(3)/7.pdf).
- [42] Devi, M. K., Banu, A. R., Gnanaprabhal, G. R., Pradeep, B. V., Palaniswamy, M. (2008). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Technology*, 1 (7), 1-6. doi: 10.17485/ijst/2008/v1i7.8.
- [43] Atıcı, T., Fidan, B. B. (2022). Organik Gıda Atıkları Kullanılarak Laboratuvarda Alg Üretim Yöntemleri. *Dünya Sağlık ve Tabiat Bilimleri Dergisi*, 5 (2), 55-66. doi: 0000-0002-0213-5887.
- [44] Chimbekujwo, K. I., Ja'afaru, M. I., & Adeyem, O. M. (2020). Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. *Scientific African*, 8 (1), 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00398>.
- [45] Shehada, W. N. (2017). *Aspergillus ve rhizopus* suşlarından proteaz enzimi üretimi ve özelliklerinin belirlenmesi. [Doktora Tezi]. Gazi Üniversitesi.

- [46] Charles, P., Devanathan, V., Anbu, P., Ponnuswamy, M., Kalaichelvan, P. T., Hur, B. (2008). Purification , characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *Journal of Basic Microbiology*, 48, 347-352. doi: 10.1002/jobm.200800043.
- [47] Ferid, A., Neysene, A., Lazar, S., Marzouki, N. M. (2014). Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease from *Aspergillus niger*. Use in Antioxidant peptides production. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5 (5), 1490-1499. doi:10.1002/jobm.201400179.
- [48] Hajji, M., Kanoun, S., Nasri, M., Gharshallah, N. (2007). Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry*, 42 (5), 791-797. doi: 10.1016/j.procbio.2007.01.011.
- [49] Chakrabarti, S., Matsumura, N., Ranu, R. S. (2000). Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). *Current Microbiology*, 40, 239-244. doi: 10.1007/s002849910048.
- [50] Lanka, S., Anjali, C. H., Pydipalli, M. (2017). Enhanced production of alkaline protease by *Aspergillus niger* DEF 1 isolated from dairy form effluent and determination of its fibrinolytic ability. *African Journal of Microbiology Research*, 11 (11), 440-449. doi: 10.5897/AJMR2016-8379.
- [51] Coral, G., Arkan, B., Güvenmez, M. N., Ünaldı, H. (2003). Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of Microbiology*, 53(4), 491-498. <https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com>.
- [52] Olajuyigbe, F.M., Ajele, J.O. (2006) Influence of media composition on acid protease production by *Aspergillus niger* (NRRL 1785). *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 12(1) , 85-88. doi: 10.4314/gjpas.v12i1.16571.
- [53] Basu, B. R., Banik, A. K., Das, M. (2007). Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB 100 grown on fish scale. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 449-455. doi:10.1007/s11274-007-9492-6.
- [54] Sattar, H., Aman, A., Qader, S. U. (2017). Effect of metal ions, solvents and surfactants on the activity of protease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 13 (1), 491-495. doi: 10.6000/1927-5129.2017.13.80.
- [55] Muazu, A. (2015). Production and characterization of extracellular protease enzyme from *Aspergillus niger* using different agro-industrial residues. *International Journal of Science and Technology*, 4(12), 535-541.
- [56] Leng, Y., Xu, Y. (2011). Improvement of acid protease production by a mixed culture of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation technique. *African Journal of Biotechnology*, 10 (35), 6824-6829. doi: 10.5897/AJB10.2221.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Betül TEKYILDIZ

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Sakarya Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü /Gıda Mühendisliği	Devam Ediyor
Lisans	Sakarya Üniversitesi / Mühendislik Fakültesi / Gıda Mühendisliği	2019
Lise	İzmit Lisesi	2015

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer	Görev
2022-Halen	Deva Holding A.Ş.	Mikrobiyoloji Uzman Yardımcısı
2021-2021	Domin Organizasyon A.Ş.	Gıda Mühendisi
2020-2021	ISS Hazır Yemek Üretim ve Hizmet A.Ş.	Yönetici Asistanı

YABANCI DİL

İngilizce