

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇİLEK MEYVESİNDEN PROTEAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE
UYGULAMA ALANLARININ ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Esmâ Hande ALICI

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Gülnur ARABACI

Nisan 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİLEK MEYVESİNDEN PROTEAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE
UYGULAMA ALANLARININ ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Esma Hande ALICI

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez 24/04/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Gülnur ARABACI

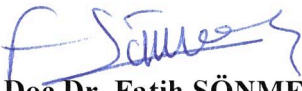
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Neslihan ŞAKİ

Üye


Doç. Dr. Ayşe AVCI

Üye


Doç. Dr. Fatih SÖNMEZ
Üye


Dr. Öğr. Üyesi Semra YILMAZER KESKİN
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.



Esmâ Hande ALICI

24.04.2019

TEŞEKKÜR

Tüm yükseköğrenim hayatım boyunca, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve bu noktaya gelirken desteğini benden esirgemeyen sayın danışman hocam Doç.Dr. Gülnur ARABACI'ya, doktora tezimin her aşamasında önerilerinden ve desteklerinden yararlandığım sayın Doç.Dr. Ayşe AVCI ve sayın Dr.Öğr.Üyesi Semra YILMAZER KESKİN'e, deneysel çalışmalarım boyunca yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm, başta Rana KÖKSAL ARIDURU olmak üzere, sevgili çalışma arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışmasını destekleyen Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No: 2017-50-02-029) çok teşekkür ediyorum.

Hayatımın her anında bana güvenen, kendi yolumu çizerken desteğini, sabrını ve sevgisini benden esirgemeyen canım aileme şükranlarımı sunuyorum.

Esma Hande ALICI

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
TABLolar LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
SUMMARY	xvi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
1.1. Proteaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar.....	3
1.2. Çalışmanın Amacı	6
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	7
2.1. Proteazların Genel Özellikleri	7
2.2. Proteaz Kaynakları	8
2.2.1. Bitkisel proteazlar	8
2.2.2. Hayvansal proteazlar	11
2.2.3. Mikrobiyal proteazlar	12
2.2.3.1. Bakteriler	13
2.2.3.2. Fungi.....	13
2.2.3.3. Virüsler	14
2.3. Proteazların Sınıflandırılması.....	14
2.3.1. Etki alanlarına bağlı olarak proteazlar	15
2.3.1.1. Ekzopeptidazlar	15

2.3.1.1.1. Aminopeptidazlar	15
2.3.1.1.2. Karboksipeptidazlar	16
2.3.1.2. Endopeptidazlar	16
2.3.1.2.1. Serin proteazlar	17
2.3.1.2.2. Aspartik proteazlar	19
2.3.1.2.3. Sistein/Tiyol proteazları	20
2.3.1.2.4. Metaloproteazlar	22
2.3.2. Faaliyet gösterdikleri pH aralığına göre proteazlar	23
2.3.2.1. Asidik proteazlar	23
2.3.2.2. Nötral proteazlar	23
2.3.2.3. Alkali proteazlar	23
2.4. Proteaz Reaksiyon Mekanizması	24
2.4.1. Serin proteazların katalitik etki mekanizması	25
2.4.2. Sistein proteazların katalitik etki mekanizması	28
2.4.3. Aspartik proteazların katalitik etki mekanizması	29
2.4.4. Metaloproteazların katalitik etki mekanizması	32
2.5. Proteazların Endüstrideki Uygulama Alanları	34
2.5.1. Çamaşır deterjanı endüstrisi	35
2.5.2. Peptid hidrolizi	36
2.5.3. Gıda endüstrisi	37
2.5.3.1. Peynir yapma	38
2.5.3.2. Fırında pişirme	38
2.5.4. Ksantan zatkının temizlenmesi	38
2.5.5. Deri endüstrisi	39
2.5.6. İlaç endüstrisi	39
2.6. Proteazların İmmobilizasyonu	40
2.6.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri	42
2.6.1.1. Fiziksel yöntem	42
2.6.1.1.1. Tutuklama	43
2.6.1.1.2. Adsorpsiyon	46
2.6.1.1.3. Mikrokapsülleme	47
2.6.1.2. Kimyasal yöntem	48

2.6.1.2.1. Kovalent bağlanma.....	48
2.6.1.2.2. Çapraz bağlama	49
2.6.1.2.3. İyonik bağlanma	50
2.6.1.2.4. Afinite ligandları ile konjugasyon.....	50
2.7. Çilek (<i>Fragaria ananassa</i> L.)	52

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM.....	54
3.1. Materyal	54
3.2. Kullanılan Araç-Gereçler	54
3.3. Analizler	55
3.3.1. Çilek proteazının saflaştırılması ve karakterizasyonu.....	55
3.3.1.1. Çilek meyvesi ham ekstraktının hazırlanması.....	55
3.3.1.2. Afinite kromatografisi ile enzimin saflaştırılması	55
3.3.1.2.1. Sefaroz 4B'nin aktifleştirilmesi	55
3.3.1.2.2. L-tirozinin bağlanması	55
3.3.1.2.3. p-aminobenzoik asit bileşiğinin bağlanması	56
3.3.1.2.4. Saflaştırma işlemi	56
3.3.1.3. Proteaz enzimi aktivite tayini	57
3.3.1.4. Protein miktarı tayini.....	58
3.3.1.5. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü ve molekül ağırlığı tayini.....	59
3.3.1.6. Enzim kinetiği	60
3.3.1.7. Saflaştırılan proteaz enziminin doğal ve modifiye substratlara karşı spesifikliğin belirlenmesi	60
3.3.1.8. Saflaştırılan proteaz enziminin p-nitroanilid (p-NA) konjuge sentetik substratlara karşı spesifikliğin belirlenmesi	61
3.3.1.9. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi	61
3.3.1.10. Proteaz enziminin termal kararlılığının belirlenmesi	62
3.3.1.11. Proteaz enziminin optimum pH'ının belirlenmesi ...	62

3.3.1.12. Proteaz enziminin pH kararlılığının belirlenmesi	63
3.3.1.13. Bazı metal iyonlarının saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine etkisinin belirlenmesi.....	63
3.3.1.14. Bazı organik çözücülerin saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine etkisinin belirlenmesi.....	64
3.3.1.15. Bazı inhibitörlerin saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine etkisinin belirlenmesi.....	64
3.3.2. Çilek proteazının immobilizasyonu	65
3.3.2.1. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu	65
3.3.2.1.1. Aljinat konsantrasyonunun optimizasyonu	65
3.3.2.1.2. CaCl ₂ konsantrasyonunun optimizasyonu.....	66
3.3.2.1.3. Enzim miktarı optimizasyonu	66
3.3.2.1.4. Kürecik miktarı optimizasyonu	67
3.3.2.2. Çilek proteazı ile birlikte immobilize edilen Co ²⁺ iyonlarının aktivite üzerine etkisinin incelenmesi.....	67
3.3.2.3. İmmobilizasyon veriminin ve etkinliğinin belirlenmesi.....	67
3.3.2.4. İmmobilize enzimin karakterizasyonu	69
3.3.2.4.1. İmmobilize enzimin optimum sıcaklık ve termal kararlılığının belirlenmesi	69
3.3.2.4.2. İmmobilize enzimin optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesi.....	70
3.3.2.4.3. İmmobilize enzimin kinetiği	71
3.3.2.4.4. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi.....	71
3.3.2.4.5. İmmobilize enzimin depolanma kararlılığı	71
3.3.3. Çilek proteazının uygulama alanlarının araştırılması	72
3.3.3.1. Çilek proteazının deterjan katkı maddesi olarak kullanımının araştırılması.....	72
3.3.3.1.1. Ağartıcı maddelerin, yüzey aktif maddelerin ve deterjanların enzim kararlılığı üzerindeki etkisi	72
3.3.3.1.2. Yıkama performansının değerlendirilmesi.....	73

3.3.3.2. Süt pıhtılaştırma aktivitesi (SPA).....	74
3.3.4. İstatistiksel analiz	74
 BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR VE SONUÇLAR	75
4.1. Çilek Meyvesinden İzole Edilen Proteaz Enziminin Saflaştırılması ...	75
4.2. SDS-PAGE ile Enzim Saflık Kontrolü ve Molekül Ağırlığı Tayini	79
4.3. Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyonu.....	80
4.3.1. Saflaştırılan proteaz enziminin BSA hidrolizine ait kinetik parametreler	80
4.3.2. Saflaştırılan proteaz enziminin protein substratlara karşı spesifiklik sonuçları	81
4.3.3. Saflaştırılan proteaz enziminin p-nitroanilid konjuge sentetik substratlara karşı spesifiklik sonuçları.....	82
4.3.4. Saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları	83
4.3.5. Saflaştırılan proteaz enziminin termal kararlılık sonuçları	84
4.3.6. Saflaştırılan proteaz enziminin pH profili.....	85
4.3.7. Saflaştırılan proteaz enzime bazı metal iyonlarının etkisi	87
4.3.8. Saflaştırılan proteaz enzime bazı organik çözücülerin etkisi..	88
4.3.9. Saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı spesifik inhibitörlerin etkileri	89
4.4. Çilek Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu.....	91
4.4.1. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu	91
4.4.1.1. Aljinat konsantrasyonunun optimizasyonu	91
4.4.1.2. CaCl ₂ konsantrasyonunun optimizasyonu.....	93
4.4.1.3. Enzim miktarı optimizasyonu	94
4.4.1.4. Kürecik miktarı optimizasyonu	95
4.4.2. Co ²⁺ İyonlarının immobilizasyon üzerine etkisinin incelenmesi	97
4.4.3. İmmobilizasyon işleminin başarısının değerlendirilmesi.....	98
4.4.4. İmmobilize enzimin özelliklerinin belirlenmesi	101
4.4.4.1. İmmobilize proteaz enziminin pH profili	101
4.4.4.2. İmmobilize proteaz enziminin termal profili.....	104

4.4.4.3. İmmobilize proteaz enziminin BSA hidrolizine ait kinetik parametreler.....	106
4.4.4.4. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirlik sonuçları	109
4.4.4.5. İmmobilize enzimin depolanma kararlılığı sonuçları	111
4.5. Çilek Proteazının Uygulama Alanlarının Araştırılması	113
4.5.1. Çilek proteazının deterjan katkı maddesi olarak kullanımının araştırılması.....	113
4.5.1.1. Oksitleyici maddelerin, yüzey aktif maddelerin ve deterjanların enzim kararlılığı üzerindeki etkisi.....	113
4.5.1.2. Yıkama performansının değerlendirilmesi	119
4.5.2. Çilek proteazının süt pıhtılaştırma aktivitesinin araştırılması...	128
BÖLÜM 5.	
SONUÇ ve ÖNERİLER.....	131
5.1. Sonuçlar.....	131
5.2. Öneriler.....	139
KAYNAKLAR	140
ÖZGEÇMİŞ	152

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
AEBSF	: 4-(2-aminoetilbensülfonilflorür)
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
Ala	: Alanin
APS	: Amonyum persülfat
Arg	: Arginin
Asn	: Asparagin
Asp	: Aspartik asit
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Bovine Serum Albumin
CM	: Karboksimetil
cm	: Santimetre
Cys	: Sistein
CoA	: Koenzim A
DEAE	: Dietilaminoetil
dk	: Dakika
DL-BAPNA	: Nα-Benzoil-DL-Arg-pNA
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPP IV	: Dipeptidilpeptidaz IV
DTNB	: Ditiyobis(2-nitrobenzoikasit)
DTT	: Ditiyoeritrol
EC	: Enzim Komisyonu
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EGTA	: Etilenglikoltetraasetikasit

E64	: trans-Epoksisüksinil-L-lösilamido(4-guanidino)bütan
FF	: Fast flow
Glu	: Glutamik asit
Gly	: Glisin
GO	: Grafen oksit
GRAS	: Generally Recognized as Safe
His	: Histidin
IAA	: İyodoasetamid
kDa	: Kilodalton
Km	: Michaelis-Menten sabiti
Leu	: Lösin
Ile	: İzölösün
Lys	: Lizin
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MMP	: Matriks metaloproteinaz
NE	: Nötrofil elastaz
NEM	: N-etil maleimid
nm	: Nanometre
OD	: Optik dansite
PA	: Proteolitik aktivite
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PCMB	: p-klorocıvabenzoat
PDB	: Protein Veri Bankası
Phe	: Fenilalanin
PMSF	: Fenilmetan sülfonilflorür
PR3	: Proteinaz 3
pNA	: p-nitroanilid
rpm	: Revolutions per minute

ROS	: Reaktif oksijen türleri
S	: Substrat
SBTI	: Soybean tyrpsin inhibitor
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SF	: Seyreltme faktörü
Ser	: Serin
SPA	: Süt pıhtılaştırma aktivitesi
Suc	: Süksinil
TCA	: Trikloroasetik asit
TEMED	: Tetraetilmetilendiamin
Thr	: Treonin
TLCK	: Tosillisin klorometilketon
TPCK	: Tosilfenilalanin klorometilketon
Tyr	: Tirozin
Tris	: Tris (hidroksimetil) amino metan
U	: Ünite aktivite
UV	: Ultraviyole
Vis	: Visible
Vmax	: Enzimatik reaksiyonun ulaştığı maksimum hız

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Proteaz enzimlerinin parçalama mekanizması.....	24
Şekil 2.2. Dört ana katalitik proteaz sınıfının parçalama mekanizmaları	25
Şekil 2.3. Bir peptid bağının proteaz enzimi ile hidrolizi	26
Şekil 2.4. Tripsin benzeri serin proteazın üç boyutlu yapısı	27
Şekil 2.5. Serin proteazların katalitik mekanizması.....	28
Şekil 2.6. Sistein proteazlarının önerilen hidroliz mekanizması.....	29
Şekil 2.7. Tipik bir aspartik proteazın üç boyutlu yapısı ve etki mekanizması	31
Şekil 2.8. Karboksipeptidaz A ve termolizin benzeri proteazlar için önerilen katalitik mekanizma.....	34
Şekil 2.9. Enzim immobilizasyonunda kullanılan tekniklerin sınıflandırılması...	42
Şekil 2.10. Polimer matrikste tutuklama	43
Şekil 2.11. Mannuronik (M) ve guluronik (G) asit monomerlerinin kimyasal yapıları ve aljinat zincir konformasyonu.....	44
Şekil 2.12. İki değerlikli katyonların α -L-guluronat kalıntılarının homopolimerik bloklarına bağlandığı "yumurta kutusu" modeli.....	45
Şekil 2.13. Ca-aljinat kürecikleri ile enzim immobilizasyonu	45
Şekil 2.14. Ca-aljinat boncuklarının oluşumu için temel mekanizma	46
Şekil 2.15. Fiziksel adsorpsiyon	47
Şekil 2.16. Mikrokapsülleme	48
Şekil 2.17. Kovalent bağlama	49
Şekil 2.18. Çapraz bağlama.....	50
Şekil 2.19. Enzim immobilizasyon teknikleri	51
Şekil 2.20. Çilek (<i>Fragaria ananassa</i> L.).....	52
Şekil 3.1. Kolon dolgu maddesinin toplu sentez reaksiyonları.....	57
Şekil 4.1. Çilek proteazının afinite kromatografisi fraksiyonlarının aktivite ve protein miktarı grafiği.....	76

Şekil 4.2. Aktivite hesaplanmasında kullanılan L-tirozin standart grafiği.....	78
Şekil 4.3. Protein miktarı hesaplanmasında kullanılan Bradford standart grafiği	78
Şekil 4.4. SDS-PAGE sonucunda elde edilen jel	79
Şekil 4.5. SDS-PAGE ile çilek proteazının saflık kontrolü ve molekül ağırlığı tayini	80
Şekil 4.6. Saf çilek proteazının BSA substratına ait Lineweaver-Burk grafiği	81
Şekil 4.7. Saf çilek proteazının BSA substratına ait optimum sıcaklık grafiği.....	84
Şekil 4.8. Saf çilek proteazının termal kararlılık grafiği.....	85
Şekil 4.9. Saf çilek proteazının optimum pH ve pH kararlılığı grafiği	86
Şekil 4.10. Saf çilek proteazı aktivitesine metal iyonlarının etkisi	88
Şekil 4.11. Saf çilek proteazı aktivitesine organik çözücülerin etkisi.....	89
Şekil 4.12. İmmobilize çilek proteaz enziminin aktivitesine aljinat konsantrasyonunun etkisi	93
Şekil 4.13. İmmobilize çilek proteaz enziminin aktivitesine kalsiyum klorür konsantrasyonunun etkisi	94
Şekil 4.14. İmmobilize çilek proteaz enziminin aktivitesine enzim çözeltisi seyrelme oranının etkisi	95
Şekil 4.15. İmmobilize çilek proteaz enziminin aktivitesine kürecik miktarının etkisi	96
Şekil 4.16. Enzimle beraber immobilize edilen Co^{2+} iyonlarının immobilize çilek proteaz enziminin aktivitesine etkisi	98
Şekil 4.17. İmmobilize ve serbest proteaz enziminin optimum pH grafiği	101
Şekil 4.18. İmmobilize proteaz enziminin optimum pH ve pH kararlılığı grafiği	102
Şekil 4.19. İmmobilize ve serbest proteaz enziminin pH kararlılığı grafiği	103
Şekil 4.20. İmmobilize ve serbest proteaz enziminin optimum sıcaklık grafiği...	104
Şekil 4.21. İmmobilize proteaz enziminin termal kararlılık grafiği.....	105
Şekil 4.22. İmmobilize ve serbest hamproteaz enziminin BSA substratına ait Michaelis-Menten grafiği.....	108
Şekil 4.23. İmmobilize proteaz enziminin BSA substratına ait Lineweaver-Burk grafiği	108

Şekil 4.24. İmmobilize ve serbest ham proteaz enziminin BSA substratına ait Lineweaver-Burk grafiği	109
Şekil 4.25. İmmobilize ve serbest proteaz enziminin depolanma kararlılığı grafiki	113
Şekil 4.26. Ticari katı deterjanların proteaz aktivitesi üzerine etkisi	117
Şekil 4.27. Ticari sıvı deterjanların proteaz aktivitesi üzerine etkisi	117
Şekil 4.28. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçaları	121
Şekil 4.29. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçalarının çeşme suyunda yıkama sonucu	122
Şekil 4.30. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçalarının çeşme suyu ve deterjan karışımında yıkama sonucu.....	123
Şekil 4.31. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçalarının çeşme suyu, deterjan ve serbest proteaz karışımında yıkama sonucu.....	124
Şekil 4.32. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçalarının çeşme suyu, deterjan ve immobilize proteaz karışımında yıkama sonucu	125
Şekil 4.33. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçalarının çeşme suyu, deterjan ve Co^{2+} -immobilize proteaz karışımında yıkama sonucu	126
Şekil 4.34. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçalarının tüm yıkama sularında yıkanıp kurutulduktan sonraki sonuçlar	127
Şekil 4.35. Ham çilek proteaz enziminin süt çöktürme aktivitesi sonuçları	130

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Bitki, hayvan ve mikroorganizma kaynaklı proteaz enzimleriyle daha önce gerçekleştirilmiş çalışmalar	4
Tablo 2.1. Proteazların başlıca özellikleri.....	17
Tablo 3.1. Çilek proteaz enzimi ile gerçekleştirilen deneylerde kullanılan ekipmanlar	54
Tablo 3.2. SDS-PAGE ayırma jeli ve yükleme jeli bileşenleri.....	59
Tablo 4.1. Çilek proteaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları	77
Tablo 4.2. Saf çilek proteazının protein substratlara karşı substrat spesifikliğı sonuçları	82
Tablo 4.3. Saf çilek proteazının oligopeptidil-p-NA konjuge sentetik substratlarına karşı spesifikliğı	83
Tablo 4.4. Saf çilek proteazının aktivitesine aktif bölge yönelimli inhibitörlerin geri dönüşümsüz inhibisyon etkisi	90
Tablo 4.5. Çilek proteaz enziminin Ca-aljinat jelde tutuklanmasının optimizasyon sonuçları	97
Tablo 4.6. İmmobilizasyon işleminin verim, etkinlik ve geri kazanım sonuçları	100
Tablo 4.7. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirlik sonuçları	110
Tablo 4.8. Yüzey aktif maddelerin ve oksitleyici maddelerin çilek proteazının kararlılığı üzerindeki etkisi	115
Tablo 4.9. Ham çilek proteazının süt çöktürme etkisi sonuçları.....	129

ÖZET

Anahtar kelimeler: serin proteaz, çilek, immobilizasyon, aljinat, deterjan, süt pıhtılaştırma

Bu çalışmada, çilek (*Fragaria ananassa*) meyvesinden izole edilen proteaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu, immobilizasyonu ve uygulama alanlarının araştırılması amaçlanmıştır. Sefaroz-4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit afinite kromatografisi kullanılarak 395,6-kat saflaştırılan proteazın molekül ağırlığı, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile 65,8 kDa olarak belirlenmiştir. Saf proteaz için optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6 ve 40 °C olarak bulunmuştur. Saf proteazın, geniş bir sıcaklık ve pH aralığında oldukça kararlı olduğu saptanmıştır. Co^{2+} iyonları çilek proteazını çok kuvvetli bir şekilde aktive etmiştir. Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} ve Mn^{2+} iyonları ise proteaz aktivitesini belirgin şekilde inhibe etmiştir. 2-propanol enzimi tamamen inhibe ederken, etanol ve metanol varlığında enzim kararlılığını daha iyi korumuştur. Çilek proteazı, doğal ve modifiye substratlar arasında en yüksek spesifikliğı hemoglobine karşı göstermiştir. Enzimin sentetik substratlara karşı spesifikliğinin de araştırılmasının ardından, geniş bir substrat spesifikliğıne sahip olduğu sonucuna varılmıştır. İnhibisyon çalışmaları çilek proteazının yüksek ihtimalle serin proteaz olduğunu ve aktivitesinin ortamdaki metal iyonlarından belirgin şekilde etkilendiğini göstermektedir. Bunun yanında, ham çilek proteazının Ca-aljinat küreciklerde immobilizasyonunun ardından, deterjan katkı maddesi ve süt pıhtılaştırıcı ajan olarak kullanımı test edilmiştir. Enzimin Ca-aljinat küreciklerde immobilizasyonu esnasında, aljinat konsantrasyonu %2 ve CaCl_2 çözeltisi konsantrasyonu %3'de sabit tutulmuştur. Enzimle beraber immobilize edilen Co^{2+} iyonlarının (1 mM) enzim etkinliğini 8,4 kat arttırdığı saptanmıştır. Immobilizasyon verimi sadece ham enzimi içeren kürecikler için %65, Co^{2+} iyonlarıyla birlikte ham enzimi içeren kürecikler için %69 olarak belirlenmiştir. Immobilizasyon sonucunda enzimin optimum sıcaklık değeri değişmezken, optimum pH değerinin 6'dan 7'ye kaydığı görülmüştür. Immobilizasyon sonrasında ham enzimin V_{max} değerinde yok denebilecek kadar küçük bir azalma ve K_m değerinde belirgin bir artış meydana gelmiştir. Çilek proteazının tekrar kullanılabilirlik özelliğı ortalama düzeyde iken, depolanma kararlılığı yüksek bulunmuştur. Test edilen tüm parametreler açısından, çilek proteazının kararlılığının immobilizasyon neticesinde arttığı saptanmıştır. Gerçekleştirilen uygulama çalışmaları, çilek proteazının iyi bir deterjan katkı maddesi olarak değerlendirilebileceğini fakat süt pıhtılaştırıcı enzim alternatifi olarak etkisinin zayıf kaldığını göstermiştir.

PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF THE APPLICATIONS OF PROTEASE ENZYME FROM STRAWBERRY

SUMMARY

Keywords: serine protease, strawberry, immobilization, alginate, detergent, milk clotting

The aim of this study was purification, characterization, immobilization and investigating some applications of the protease isolated from strawberry (*Fragaria ananassa*) fruit. The molecular weight of protease, that was 395.6-fold purified by using Sepharose-4B-L-tyrosine-p-amino benzoic acid affinity chromatography, was determined to be 65.8 kDa by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Optimum pH and temperature for the pure enzyme were 6 and 40 °C, respectively. The pure protease was stable at a wide range of temperature and pH. Co^{2+} ions stimulated protease activity very strongly. Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} and Mn^{2+} ions significantly inhibited protease activity. While 2-propanol completely inhibited the enzyme, the enzyme maintained its activity better in the presence of ethanol and methanol. The strawberry protease showed the highest specificity towards hemoglobin among all the natural and modified substrates tested. The specificity of the enzyme towards synthetic substrates was also investigated and it was concluded that it has broad substrate specificity. Inhibition studies indicated that this purified protease was highly-likely a serine protease and its activity was significantly affected by the presence of metal ions. Furthermore, after the immobilization of crude strawberry protease in Ca-alginate beads, the use of crude protease as a detergent additive and milk coagulating agent was tested. During immobilization of the enzyme in Ca-alginate beads, the alginate concentration was kept constant at 2% and the CaCl_2 solution concentration at 3%. Co^{2+} ions (1 mM) immobilized together with the crude enzyme were found to increase the enzyme activity by 8.4 fold. The immobilization yield was determined to be 65% for the beads containing only the crude enzyme and 69% for the beads containing crude enzyme and Co^{2+} ions together. As a result of the immobilization, the optimum temperature value of the enzyme did not change and the optimum pH value changed from 6 to 7. After immobilization, there was a slight decrease in V_{max} and a significant increase in K_m of the crude enzyme. While the reusability of the strawberry protease was at an average level, the storage stability was found to be high. In terms of all the parameters tested, the stability of the strawberry protease increased as a result of immobilization. The application studies showed that strawberry protease can be considered as a good detergent additive but a weak milk clotting enzyme alternative.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Proteinazlar veya peptidazlar olarak da adlandırılan proteazlar, protein moleküllerinin peptidlere ve amino asitlere parçalanmasını sağlayan hidrolitik reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir [1]. Bu enzimler, tüm organizmalarda (bitkiler, hayvanlar ve ayrıca çoğu mikroorganizmalar) halihazırda yaygın olarak bulunurlar; insan genomunun yaklaşık %2'sini ve enfeksiyöz organizma genomlarının %1-5'ini oluştururlar [2]. Proteaz enzim ailesinin sadece insanlarda 569'dan fazla, fare ve sıçanlarda ise daha fazla üyesi vardır. Temel fizyolojik süreçlerdeki anahtar enzimlerden olan proteazlar çeşitli biyokimyasal ve düzenleyici işlevlere sahiptirler. Bu enzimler, sinyal yolağının aktivasyonu, yapısal yeniden şekillenme, hücre çoğalması ve doku gelişimine aracılık yapan çeşitli proteolitik olayları ve ayrıca hücrel apoptoz, enflamatuvar yanıt, kan pıhtılaşması ve hormon işleme yolları gibi hücrel olayların sonlandırılması olaylarını katalizler. Canlıların hayatta kalması, korunması ve yaşamlarının düzenlenmesinde önemli bir rol üstlenmektedirler [2,3]. Proteaz aktivitelerinde meydana gelen herhangi bir anormallik; kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif bozukluklar ve kanser gibi hastalıklara ve mikrobiyal enfeksiyonlara yol açar. Bu bağlamda proteaz fonksiyonları, kanser ve metastaz konusundaki kapsamlı çalışmaların odağı olmuştur [3,4].

Bugün hala proteazlar hangi kaynaktan izole edildikleri, katalitik aktiviteleri (ekzo-veya endopeptidazlar), substrat spesifiklikleri, moleküler büyüklükleri gibi özelliklerine göre sınıflandırılıyor olsalar da, Enzim Komisyonu (EC) tarafından önerilen tüm enzimlerin altı ana sınıfta toplandığı daha rasyonel bir sistem daha sıklıkla tercih edilmektedir. Bu sisteme göre, proteazlar üçüncü enzim sınıfında (hidrolazlar) ve dördüncü alt grupta (peptid bağlarını hidrolizleyen) yer almaktadırlar [1,4].

En büyük üç endüstriyel enzim grubundan birini temsil eden proteazlar, toplam küresel enzim satışlarının %60'ını oluşturan önemli endüstriyel enzimlerdir. Çok yönlülüğü sayesinde proteazlar başlıca temizlik, kozmetik, tekstil ve deri endüstrilerinde ve ayrıca gıda sektöründe gıdaların işlenmesinde kullanılmaktadırlar [1,5].

Proteazlar hayvanlardan ve bitkilerden elde edilebilse de ekonomik, teknik, biyokimyasal ve genetik avantajları nedeniyle endüstriyel enzimlerin büyük çoğunluğu esasen mikroorganizmalardan elde edilmiştir. Ancak, endüstriyel prosesler, farmakoloji ve biyoteknoloji uygulamaları ile bitki kaynaklı enzimler gittikçe önem kazanmaktadırlar [5,6]. Mikrobiyal orijinli proteazlara kıyasla üretim maliyetleri daha yüksek olmasına rağmen bitki proteazları, gıda, ilaç ve deterjan endüstrisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Papain, bromelin ve fisin gibi çeşitli sistein proteazları, gıda sektöründe mayalama, süt çöktürme ve et yumuşatma gibi işlemlerde ve ayrıca peynir ve içecek endüstrileri için oldukça çözünür ve aromalı protein hidrolizatlarının hazırlanması, emülgatörlerin üretimi amacıyla katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Çeşitli bitki proteazlarının endüstride; kültür ortamı formülasyonu, genetik materyalin izolasyonu, lizin gibi esansiyel amino asitlerin üretimi, atık su sistemlerinin tıkanmasının önlenmesi ve deriden tüy giderme işlemini içeren diğer kullanımları da bilinmektedir. Proteazlar sadece endüstriyel olarak değil farmasötik uygulamalarda da önemli bir yere sahiptir; yüksek miktarda proteolitik enzim içeren bitki özütleri geleneksel tıpta uzun zamandır kullanılmaktadır.

Proteazlar, *Asclepiadaceae*, *Moraceae*, *Asteraceae*, *Caricaceae*, *Euphorbiaceae* ve *Apocynaceae* gibi çeşitli bitki ailelerinin lateks kısmından tanımlanmış ve incelenmiştir. Son yıllarda, bitki proteazları, geniş substrat spesifikliğine sahip olmaları ve geniş bir sıcaklık ve pH aralığında aktif olmalarından dolayı ilgi çekmektedirler [6,7]. Çeşitli endüstriyel proseslerin geliştirilebilmesi amacıyla farklı özelliklere sahip yeni enzimlerin keşfi her zaman talep görmektedir. Yeni enzimlere bu büyük talep nedeniyle, araştırmacılar sürekli yeni enzim kaynakları araştırmakta ve ayrıca proteazların farklı yönlerini keşfetmektedirler [1]. Bitkisel kaynaklı

proteazlar endüstride yaygın olarak kullanılmasına rağmen, çeşitli meyve ve sebzelerden proteaz üretim potansiyeli hakkında yapılan araştırmalar sayıca yeterli değildir. Yeni bitkisel kaynaklı proteazları ve özelliklerini belirlemek için, çeşitli bitki türleri arasındaki proteaz dağılımı araştırılmalıdır [7]. Tüm bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada proteaz enziminin çilek meyvesinden izolasyonu, saflaştırılması, immobilizasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

1.1. Proteaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar

Proteazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi farklı kaynaklardan elde edilebilmektedirler. Bitki ve hayvan proteazlarının dünyadaki ihtiyacı karşılayamamalarından dolayı mikrobiyal proteazlara olan ilgide bir artış olmuştur. Mikroorganizmalar, geniş biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik müdahalelere yatkınlıklarından dolayı mükemmel enzim kaynaklarıdır. Dolayısıyla, mikrobiyal kaynaklardan elde edilen proteazlar, bitkisel veya hayvansal kaynaklardan elde edilenlere göre daha fazla tercih edildiğinden, literatürde proteazlarla gerçekleştirilen çalışmaların çoğunluğunun mikrobiyal proteazlara ait olduğu görülmektedir [8].

Günümüzde birçok bakteri, fungus ve mayaların dışında aktinomisetlerin de proteaz üreticisi oldukları bilinmektedir ancak bunların az bir kısmı ticari kullanım için uygun üreticiler olarak değerlendirilmektedir. Çünkü üretici suşun aynı zamanda genel olarak güvenli olması, toksik ve patojenik olmaması da gerekmektedir [8, 9].

Bitki, hayvan ve mikroorganizma kaynaklı proteaz enzimleriyle gerçekleştirilmiş bazı çalışmalar Tablo 1.1.'de verilmiştir. Bu tabloda proteaz enzimleriyle ilgili; kullanılan saflaştırma metodu, molekül ağırlığı, hangi proteaz ailesine dahil olduğu, optimum pH ve sıcaklık değerleri, karakterizasyonda kullanılan substrat ve inhibitörler ile ilgili bilgiler verilmiştir.

Tablo 1.1. Bitki, hayvan ve mikroorganizma kaynaklı proteaz enzimleriyle daha öce gerçekleştirilmiş çalışmalar

Kaynak	Saflaştırma	MA (kDa)	Tipi	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)
Bitki					
<i>Euphorbia hirta</i> [10]	İyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi (3,39 kat)	34	Serin	7,2	50
<i>Plumeria rubra</i> Linn. [11]	Aseton çöktürmesi, DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi, Sefadeks G-50 ve G-200 kromatografisi (32,9 kat)	81,85	Nötral	7	55
<i>Ficus religiosa</i> [12]	Amonyum sülfat çöktürmesi, Anyon değişim kromatografisi, Jel filtrasyon kromatografisi (2,29 kat)	80	Serin	6-8	45-50
<i>Citrus aurantium</i> L. [13]	-	-	Aspartik	4-8-10	65-75
Hayvan					
<i>Neanthes japonica</i> (su kurdu) [14]	Amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik kromatografi, DEAE-Sefaroz iyon değişim kromatografisi, Sephacryl S-100 jel filtrasyon kromatografisi (1556 kat)	28,6-33,5	Serin	9	40
<i>Sardinella aurita</i> (balık) [15]	Amonyum sülfat çöktürmesi, Sefadeks G-100, G-75 Jel filtrasyon kromatografisi, Katyon değişim kromatografisi (9,5kat)	17	Aspartik	3	40
<i>Tenodera sinensis</i> (peygamber devesi) [16]	Amonyum sülfat çöktürmesi, Anyon değişim kromatografisi, Jel filtrasyon kromatografisi, Afinite kromatografisi, Mono-Q iyon değişim kromatografisi (5120 kat)	32,9	Serin	5	30
<i>Strongylocentrotus intermedius</i> [17]	Sefadeks G-100, G-200 Jel filtrasyon kromatografisi, Hidrofobik kromatografi, DEAE-Selüloz iyon değişim kromatografisi (220 kat)	44-45	-	8	-
Mikroorganizma					
Bakteri					
<i>Bacillus alveayuensis</i> CAS5 [18]	Amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Selüloz iyon değişim kromatografisi, Jel filtrasyon kromatografisi (7,77 kat)	33	Alkali	9	50
<i>Bacillus megaterium</i> [19] (P1 ve P2 izoenzimleri)	Amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Selüloz iyon değişim kromatografisi, Jel filtrasyon kromatografisi Sefadeks G200 (P1: 13,63 kat/ P2: 7,72 kat)	P1:28, P2: 25	Serin	7,5 (P1,P2)	50 (P1, P2)
<i>Bacillus koreensis</i> (BK-P21A) [20]	Amonyum sülfat çöktürmesi, Süperdeks 200, Süperdeks 75 jel filtrasyon kolon kromatografisi (5 kat)	48	Serin	9	60
<i>Bacillus</i> sp. EMB9 [21]	Amonyum sülfat çöktürmesi, CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi (488,9 kat)	29	Serin	9	55
Küf					
<i>Aspergillus parasiticus</i> [22]	Amonyum sülfat ve aseton çöktürmesi, CM-Sefaroz iyon değişim kromatografisi (2,19 kat)	36	Serin	7	50
<i>Purpureocillium lilacinum</i> LPS # 876 [23]	Amonyum sülfat çöktürmesi, Jel filtrasyon kromatografisi Sefadeks G25-Süperdex75, DEAE-Sefadeks anyon değişim kromatografisi, Sp-Sefaroz-FF kolon kromatografisi (19,8 kat)	37	Serin	8-9	-

Tablo 1.1. (Devamı)

Kaynak	Substrat	İnhibitör*
Bitki		
<i>Euphorbia hirta</i> [10]	azokazein, jelatin, fibrinojen, fibrin, trombin, sentetik substratlar	PMSF, AEBSF, leupeptin, E64, HgCl ₂ , EDTA, pestatin A
<i>Plumeria rubra</i> Linn. [11]	kazein	iyot, iyodoasetik asit, kobalt klorür, çinko klorür, gümüş nitrat, cıva klorür ve p-hidroksicivabenzotat
<i>Ficus religiosa</i> [12]	kazein, hemoglobin, sentetik substratlar	PMSF, kimostatin, İyodoasetamid, HgCl ₂ , EDTA, EGTA, o-fenantrolin
<i>Citrus aurantium</i> L. [13]	kazein, hemoglobin, sığır serum albümini (BSA)	Pepstatin A, leupeptin, PMSF, EDTA, DTT, TLCK
Hayvan		
<i>Neanthes japonica</i> [14]	azokazein, fibrinojen	PMSF, EDTA, EGTA, SBTI, β-merkaptotanol, iyodoasetat, benzamidin, aprotinin, pepstatinA
<i>Sardinella aurita</i> [15]	hemoglobin	
<i>Tenodera sinensis</i> [16]	azokazein, sentetik substratlar	PMSF, TLCK, aprotinin, benzamidin, SBTI, elastinal, kimostatin, EDTA, EGTA, sistein, β-merkaptotanol
<i>Strongylocentrotus intermedius</i> [17]	n,n'-dimetil kazein, sentetik substratlar	kimostatin, EDTA, EGTA, TPCK
Mikroorganizma		
<i>Bacillus alveayuensis</i> CAS5 [18]	kazein, azokazein, albumin, jelatin, hemoglobin, BSA	PMSF, EDTA, DTNB, SBTI, β-merkaptotanol
<i>Bacillus megaterium</i> [19]	jelatin	EDTA, EGTA, PMSF
<i>Bacillus koreensis</i> (BK-P21A) [20]	kazein	PMSF, EDTA, β-merkaptotanol
<i>Bacillus</i> sp. EMB9 [21]	kazein, BSA, jelatin, kollajen, fibrinojen, hemoglobin	PMSF, EDTA, SBTI, β-merkaptotanol, PCMB, DTT, NEM, E-64, 1,10-fenantrolin
<i>Aspergillus parasiticus</i> [22]	azokazein, keratin	EDTA, PMSF, iyodoasetamid, pepstatin A, leupeptin, benzamidin hidroklorür, kimostatin, NEM
<i>Purpureocillium lilacinum</i> LPS # 876 [23]	azokazein, keratin	PMSF, EDTA, 1,10-fenantrolin, İyodoasetat, Pepstatin A

*PMSF (fenilmetan sülfonilflorür), SBTI (soya fasülyesi tripsin inhibitörü), EDTA(etilendiamintetraasetik asit), PCMB (p-klorocivabenzotat), DTT (ditiyoeritrol), NEM (N-etil maleimid), E-64 (trans-Epoksissüksinil-L-lösilamido (4-guanidino)bütan), TLCK (tosillisin klorometilketon), TPCK (tosilfenilalanin klorometilketon), AEBSF (4-(2-aminoetilbenzensülfonilflorür)), EGTA(Etilenglikoltetraasetik asit), DTNB (ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)).

1.2. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasında; proteaz enziminin çilek meyvesinden izolasyonu, saflaştırılması, saf enzimin karakterizasyonu ve ayrıca endüstriyel işlemlerde uygulanabilirliğinin test edilmesi için ham çilek proteazının immobilizasyonu, immobilize enzimin karakterizasyonu ve ardından deterjan katkı maddesi ve süt pıhtılaştırıcı ajan olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.



BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Proteazların Genel Özellikleri

Proteinler, tüm organizmalar için kritik bileşenlerdir ve neredeyse bütün hücrel işlevlerde yer alırlar. Protein üretiminin yanı sıra proteinlerin degradasyonu da önemlidir çünkü işlevsiz/hasarlı proteinlerin geri dönüşümünün ve yeni proteinler oluşturmak için amino asitleri serbest bırakmanın bir yoludur. Proteazlar (proteazlar veya peptidazlar), proteini oluşturmak için amino asitleri bağlayan peptid bağlarını hidrolizleyerek protein katabolizmasını gerçekleştiren enzimlerdir. Proteazlar, proteinlerde iç kısımlardaki (endopeptidazlar), N-terminaldeki (aminopeptidazlar) veya C-terminaldeki (karboksipeptidazlar) peptid bağlarını hidrolizleyebilme yeteneğine sahiptirler. Proteinlerdeki peptid karbonil grubuna saldırılarak gerçekleşen peptid bağının hidrolizine proteoliz denir. Proteoliz (proteolitik aktivite) en önemli biyolojik katalitik reaksiyonlardan biridir.

Proteazlar oldukça geniş bir dağılıma sahiptirler, tüm organizmalarda bulunurlar. İnsanlarda bilinen yaklaşık 990 proteaz geni vardır [5]. Bugüne kadar, en az 500-600 proteaz biyoinformatik analiz kullanılarak tanımlanmıştır. En az 40 proteazın biyolojik fonksiyonları genetik çalışmalar ile ortaya konmuştur. Biyolojik fonksiyonların çeşitliliği muazzamdır ve tüm proteaz sınıfları boyunca uzanır [24].

Proteazlar, protein substratlarının parçalanması yoluyla prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde hücrel reaksiyonları kontrol ederler; dolayısıyla metabolik ve fizyolojik süreçlerde önemli roller üstlenmişlerdir [25]. Proteolize yüklenen fonksiyonlar arasında; anormal/yanlış katlanmış, modifiye edilmiş ve yanlış hedeflenmiş proteinlerin giderilmesi, yeni proteinler üretmek için gerekli amino asitlerin

sağlanması, zimojenlerin ve peptid hormonlarının sınırlı parçalamalarla olgunlaşmasına katkı, anahtar enzimlerin ve düzenleyici proteinlerin miktarını azaltarak metabolizmanın ve homeostazın kontrolü, ve organellere nihai entegrasyonundan önce proteinlerden hedefleme sinyal peptidlerinin parçalanması sayılabilir [6]. Substrat-spesifik olmayan proteazlar protein geri kazanımına ve sindirime katılırken, sekans-spesifik proteazlar zimojen aktivasyonu, katalitik kaskadlar ve hücre canlılığı veya ölümüyle ilgili diğer fizyolojik süreçler için gereklidir [26]. Proteazlar, protein döngüsündeki geleneksel rollerinin yanı sıra, bir dizi hayati fizyolojik ve patolojik sürece katılan önemli sinyal molekülleri olarak tanımlanmıştır. Matriks metaloproteinaz (MMP), kalpain, katepsin ve kaspaz dahil olmak üzere hücre dışı ve hücre içi proteazlar, kardiyovasküler hastalıklar ve yeniden yapılanma açısından en yaygın olarak incelenenler proteazlar arasındadır [5].

2.2. Proteaz Kaynakları

Proteazlar çeşitli biyolojik kaynaklar arasında yaygın olarak dağılmıştır. Canlı organizmaların çeşitli fizyolojik fonksiyonları yerine getirmeleri için gerekli olmaları sebebiyle proteazlar, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çok çeşitli kaynaklarda bulunmaktadır [27].

2.2.1. Bitkisel proteazlar

Çoğu organizmada büyüme ve gelişme, protein sentezi ve organel biyogenezi ile proteoliz ve organel döngüsü arasındaki genel dengenin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bitkilerde, çimlenme, farklılaşma ve morfogenez, yaşlanma ve programlanmış hücre ölümü gibi farklı gelişim aşamalarına bağlı protein yıkımı süreçleri bilinmektedir. Öte yandan, bazı durumlarda proteolizin reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif stres ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmaların sayısı gitgide artmaktadır [28].

Bitki proteazları bitki fizyolojisi ve gelişiminin birçok yönüyle ilgilidir. Protein döngüsü, yanlış katlanmış proteinlerin parçalanması, yaşlanma ve ubiquitin/proteazom

yolu gibi süreçlerde çok önemli rollere sahiptirler. Proteazlar, yüksek derecede spesifik bölgelerdeki sınırlı proteoliz yoluyla gerçekleşen proteinlerin post-translasyonel modifikasyonundan da sorumludur. Kloroplastlardaki fotoinhibisyon, savunma mekanizmaları, programlanmış hücre ölümü ve gelişen fidelerdeki fotomorfogenez olaylarını içeren çok çeşitli hücresel süreçlerde yer alırlar. Proteazlar böylelikle; tohum çimlenmesi sırasında depo proteinlerinin mobilizasyonundan hücre ölümü ve yaşlanma programlarının başlatılmasına kadar bitki yaşam döngüsünün tüm aşamalarında yer alırlar [6].

Bitkilerde protein yıkımı, farklı hücre kompartmanlarında gerçekleştirilebilen çok sayıda proteolitik yolu içeren karmaşık bir süreçtir. Proteolitik aktivitenin varlığı, vakuoller, kloroplastlar, hücre duvarı, mikrozomlar, mitokondri, sitosol ve Golgi cisimciği gibi birçok hücresel kısımda bildirilmiştir. Hücresel düzeyde, proteolitik süreçler genellikle organel biyogenezi ve otofaji dahil olmak üzere çoğu hücre bileşeninin düzenlenmiş döngüsünün bir sonucu olarak gerçekleşir. Organel biyogenezi sırasında, öncül proteinlerin kendi hedef kompartmanlarına (mitokondri, kloroplastlar, endoplazmik retikulum, vb.) translokasyonu, genellikle bir sinyal peptidinin parçalanmasını gerektirir. Polipeptid, membranı geçtikten sonra nihai olgun proteini oluşturmak için katlanır. Bu olayda, zarın her iki tarafında şaperonlar bulunur ve proteinlerin tüm işleme süreçlerini kolaylaştırır. Proteoliz, mitokondri, kloroplast ve endoplazmik retikulum organellerinin yanısıra, peroksizomlarda tiyolaz, açıl-CoA oksidaz ve malat dehidrogenaz gibi bazı proteinlerin alınması için gerekli bir süreç olması açısından da önemlidir. Translasyon sırasında meydana gelen hatalar sonucunda oluşan anormal/yanlış katlanmış ve yanlış hedeflenmiş polipeptidler de proteolitik olarak yıkılmaktadır [28].

Proteazlar, *Asteraceae*, *Caricaceae*, *Moraceae*, *Asclepiadaceae*, *Apocynaceae* ve *Euphorbiaceae* gibi çeşitli bitki ailelerinin lateksinden tanımlanmış ve incelenmiştir. Bitki kaynaklı proteazların çoğu, sistein proteazları olarak ve daha nadiren aspartik proteazlar olarak sınıflandırılmıştır [6]. Papain, bromelin, keratinazlar ve fisin bitki kaynaklı iyi bilinen bazı proteazlardır. Papain geleneksel bir bitki proteazıdır ve uzun bir kullanım öyküsü vardır. Batı ve orta Afrika ve Hindistan'ın subtropikal

bölgelerinde yetiştirilen *Carica papaya* meyvelerinin lateksinden elde edilir. Enzimi içeren ham ekstrakt, birkaç proteinaz ve peptidaz izozimlerinin varlığına bağlı olarak daha geniş bir spesifikliğe sahiptir. Enzim pH 5 ve 9 arasında aktiftir ve substratların varlığında 80 veya 90 °C'ye kadar kararlıdır. Bromelin, ananasın kök ve meyve kısımlarından elde edilir. Enzim bir sistein proteazı olarak karakterize edilmiştir ve pH 5 ile 9 arasında aktiftir. İnaktivasyon sıcaklığı 70 °C'dir ve papainin inaktivasyon sıcaklık değerinden daha düşüktür [27].

Bitkilerdeki sistein proteazlar çeşitli dış uyaranlara yanıt olarak; protein olgunlaşması, degradasyonu ve protein yeniden yapılandırmasında yer alır ve anormal yanlış katlanmış proteinleri uzaklaştırmak için bir temizlik işlevi de görür. Sistein proteazlarının, yaşlanma, kuraklık ve programlanmış hücre ölümü gibi süreçlerde proteolizde rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca, tohumlarda depolama proteinlerinin birikmesinde ve mobilize edilmesinde de rol oynarlar. Böylece, hem anabolik hem de katabolik süreçlere katılırlar ve farklı dış uyaranlara tepki olarak protein olgunlaşması, degradasyonu ve proteinin yeniden oluşturulmasının yanında sinyal yollarında yer alırlar. Hidrolitik enzimlerin bitki savunma cevabında yer almasından dolayı sistein proteazlarının böcek direncinde bir role sahip olduğuna inanılmaktadır. Bitki savunmasında sistein proteazlarının üç potansiyel rolü vardır: istilacının algılanması, geçici sinyal yollarının aktivasyonu ve bir savunma müdahalesinin uygulanması. Papain, fisin ve bromelin gibi sistein proteazlarının papaya ağaçlarını otçul zararlılardan koruduğu gösterilmiştir. Papain benzeri sistein proteazları, dejeneratif, invazif ve bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıklarda proteolitik aktivitede anahtar enzimler olarak tanımlanmıştır. Bu proteaz ailesi, osteoporoz, artrit, vasküler hastalıklar ve kanser gibi aşırı ekstrasellüler matriks degradasyonu ile karakterize edilen hastalıklarda potansiyel farmasötik ilaç hedefi olarak dikkat çekmektedir. Bunlar ayrıca, ana alerjenlerin yanısıra, büyüme, hücre farklılaşması, sinyal iletimi ve çeşitli insan ve hayvan patojenleri (sıtma, Chagas hastalığı ve şistozomiyaza neden olan patojen parazitler) konakçı istilasının kritik bileşenleri olarak tanımlanmıştır [6].

Bunların dışındaki diğer sistein proteazları, epidermal hücrelerin kaderini, çiçeklenme zamanını, çiçeklerin sapları üzerindeki duruşunun yapılanmasını ve polen veya embriyo gelişimini düzenler [24].

Serin proteazların genellikle esasen degradatif enzimler olarak hareket ettiği düşünülür. Ancak, bitki subtilazlarının (subtilisin benzeri serin proteazlar), simbiyoz, aşırı duyarlılık tepkisi, bitki hücrelerinin enfeksiyonu, virüs ile enfekte olmuş bitkilerde patojenez, çimlenme, hücrelerel sinyal iletimi, doku farklılaşması, yaşlanma, programlanmış hücre ölümü ve protein yıkımı/işlenmesi gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde yer aldığı belgelenmiştir [6].

Ayrıca, bitkilerin botanik gruplarının bazılarının, saç parçalayan keratinazlar gibi proteazları ürettiği bilinmektedir [27].

Bitkilerden elde edilen proteolitik enzimler, geniş bir sıcaklık ve pH aralığında aktif olabildikleri için oldukça ilgi çekicidir. Proteinlerin proteazlar tarafından parçalanmasını içeren bazı endüstriyel süreçler mevcuttur ve bu proteazların bazıları bitkilerden ekstrakte edilmektedir [6]. Fakat şunu da belirtmek gerekir ki bitkilerin bir proteaz kaynağı olarak kullanılması, tarıma elverişli arazinin mevcudiyeti ve iklim koşullarının büyüme için uygunluğu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Ayrıca, bitkilerden proteaz üretimi zaman alıcı bir süreçtir [27].

2.2.2. Hayvansal proteazlar

Hayvansal kökenli en bilinen proteazlar pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir. Bunlar saflaştırılmış halde büyük miktarlarda hazırlanırlar. Ancak, üretimleri, kasaplık canlı hayvan bulunmasına bağlıdır; bu da tarım politikalarına bağlı olarak yönetilmektedir [27].

Tripsin, gıda proteinlerinin hidrolizinden sorumlu ana bağırsak sindirim enzimidir. Bir serin proteazıdır ve lizin ve arginin kalıntılarının sağladığı karboksil gruplarını içeren peptid bağlarını hidrolizler. Proteaz inhibitörlerinin böcek bağırsağındaki

tripsin enzimini inhibe etme kabiliyetine dayanarak, bu enzim böcek haşerelerinin biyokontrolü için bir hedef olarak dikkat çekmiştir [27].

Kimotripsin hayvan pankreatik ekstraktında bulunur. Saf kimotripsin pahalı bir enzimdir ve sadece teşhis ve analitik uygulamalar için kullanılır. Bu enzim, karboksil gruplarının üç aromatik amino asitten biri, yani fenilalanin, tirozin veya triptofan tarafından sağlandığı peptid bağlarının hidrolizine spesifiklik gösterir. Süt proteini hidrolizatlarının alerjikliğinin giderilmesinde yaygın olarak kullanılır. Bir prekürsör, kimotripsinojen, formunda pankreasta depolanır ve çok adımlı bir işlemle, tripsin ile aktive edilir [27].

Pepsin neredeyse tüm omurgalıların midelerinde bulunan bir asidik proteazdır. Aktif enzim, hidroklorik asit mevcudiyetinde otokataliz ile zimojenden, yani pepsinojenden, salınır. Pepsin bir aspartik proteazdır. Pepsin enzimi pH 1 ve 2 arasında optimum aktivite sergiler. Pepsin pH 6'nın üzerinde inaktif olur. Enzim, iki hidrofobik amino asit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini katalizler [27].

Rennet (renin, kimozen), bütün emziren memelilerin midelerinde inaktif bir prekürsör olarak (pro-renin) üretilen pepsin benzeri bir proteazdır. Pepsin veya otokataliz etkisi ile aktif renine dönüştürülür. Süt endüstrisinde yaygın olarak, lezzetli ve dayanıklı lor peyniri üretmek için kullanılır [27].

2.2.3. Mikrobiyal proteazlar

Bitki ve hayvan proteazlarının mevcut dünya taleplerini karşılamadaki yetersizliği, mikrobiyal proteazlara olan ilginin artmasına neden olmuştur. Mikroorganizmalar, geniş biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyona yatkınlıkları nedeniyle mükemmel bir enzim kaynağıdır. Mikrobiyal proteazlar dünya çapında toplam enzim satışlarının yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen proteazlar, biyoteknolojik uygulamalar için istenen tüm özelliklere sahip olduklarından, çoğu zaman bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere tercih edilmektedirler [27].

2.2.3.1. Bakteriler

Esas olarak nötral ve alkali olan çoğu ticari proteaz, *Bacillus* türüne ait organizmalar tarafından üretilir. Bakteriyel nötral proteazlar dar bir pH aralığında (pH 5 ile 8) aktiftir ve nispeten düşük termotoleranslıdır. Orta derecedeki reaksiyon hızlarından ötürü, nötral proteazlar, hayvansal proteinazlara göre hidrolizlenmiş gıda proteinlerinde daha az acılık oluşturur ve dolayısıyla gıda endüstrisinde kullanım için değerlidir. Bir nötral proteaz olan nötraz, doğal bitki proteinaz inhibitörlerine karşı duyarsızdır ve bu nedenle bira endüstrisinde kullanılmaktadır. Bakteri nötral proteazları, hidrofobik amino asit çiftleri için yüksek afiniteleri ile karakterize edilir. Düşük termotoleransları, düşük hidroliz derecesine sahip gıda hidrolizatlarının üretimi sırasında reaktifliklerinin kontrol edilmesi açısından avantajlıdır. Nötral proteazların bazıları aktiviteleri için divalent metal iyonları gerektiren metaloproteaz sınıfına ait proteazlarken, diğerleri şelatlayıcı maddelerden etkilenmeyen serin proteazlardır. Bakteriyel alkali proteazlar, alkali pH'daki (örneğin pH 10) yüksek aktiviteleri ve geniş substrat spesifiklikleri ile karakterize edilirler. Optimum sıcaklıkları 60 °C civarlarındadır. *Pseudomonas* genellikle birçok proteolitik enzim üreten gram-negatif bir bakteridir. Bu bakterinin salgıladığı proteazların çoğu alkali proteazlardır. *Pseudomonas aeruginosa*, birçok suştan saflaştırılmış ve karakterize edilmiş bir dizi farklı proteaza sahiptir [27].

2.2.3.2. Fungi

Mantarlar, bakterilerden çok daha çeşitli enzimler üretirler. Örneğin *Aspergillus oryzae* asidik, nötral ve alkali proteazları üretir. Fungal proteazlar geniş bir pH aralığında (pH 4 ile 11) aktiftir ve geniş bir substrat spesifikliğine sahiptir. Bununla birlikte, bakteriyel enzimlerden daha düşük bir reaksiyon hızına ve daha düşük bir termotoleransa sahiptirler. Fungal enzimler, katı hal fermantasyon işleminde uygun şekilde üretilebilirler. Fungal asidik proteazlar 4 ile 4,5 arasında bir optimum pH değerine sahiptirler ve pH 2,5 ile 6 arasında kararlıdır. Peynir endüstrisinde dar pH ve sıcaklık aralığında aktiflik gösterme özelliklerinden dolayı özellikle yararlıdır.

Fungal nötral proteazlar, pH 7'de aktif olan ve şelatlayıcı maddelerle inhibe edilen metaloproteazlardır [27].

2.2.3.3. Virüsler

Viral proteazlar, AIDS ve kanser gibi bazı ölümcül hastalıklara neden olan virüs proteinlerinin işlenmesindeki fonksiyonel katılımları nedeniyle önem kazanmıştır. Serin, aspartik ve sistein peptidazları çeşitli virüslerde bulunur. Viral montaj ve replikasyon için gerekli olan retroviral aspartil proteazlar homodimerlerdir ve poliprotein prekürsörün bir parçası olarak ifade edilirler. Olgun proteaz, prekürsörün otolizi ile serbest bırakılır [27].

2.3. Proteazların Sınıflandırılması

Muazzam çeşitlilikleri nedeniyle proteazlar, katalizlenen reaksiyonun türü, yapıları, aktif bölgeleri ve aktif oldukları pH aralığı gibi birçok özellik gözönüne alınarak çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler [29]. Proteazlar, etki alanlarına bağlı olarak ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır [27]. Ekzopeptidazlar bir peptidin N- ya da C-terminalinden bir ya da birkaç amino asidi koparırlar, buna karşın endopeptidazlar, peptidin her iki terminalinden uzaktaki, iç kısımlardaki peptid bağlarını parçalamaktadırlar [30]. Ayrıca, aktif bölgedeki fonksiyonel gruba bağlı olarak proteazlar; serin proteazlar (EC 3.4.21), sistein proteazlar (EC 3.4.22), aspartik proteazlar (EC 3.4.23) ve metaloproteazlar (EC 3.4.24) olmak üzere dört belirgin gruba ayrılırlar [27]. Proteaz aktif bölgesinin yapısı substratın bağlanmasını belirler ve substratın enzime nasıl uyum göstereceğini tayin eder ve sonuç olarak, proteazın substrata spesifikliğini tanımlamaktan sorumludur. Bu spesifiklik, enzimin hidrolizi gerçekleştirebileceği konumu belirler ve hidrolizlenecek proteine göre hidroliz derecesinin ve aynı zamanda salınan (koparılan) amino asitlerin profilinin modüle edilmesinde önemlidir. Bununla beraber, proteazlar faaliyet gösterdikleri pH aralığına göre de asidik, nötral ve alkali proteazlar olarak adlandırılabilirler [29]. Standart sınıflandırmaya tam olarak

uymayan çeşitli proteazlar da mevcuttur. Örneğin aktivite için ATP'ye gereksinim duyan ATP-bağımlı proteazlar gibi.

2.3.1. Etki alanlarına bağlı olarak proteazlar

2.3.1.1. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar sadece polipeptid zincirlerinin uç kısımlarına etki ederler. N- veya C-terminal'deki etki yerlerine göre bunlar sırasıyla, aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar olarak sınıflandırılırlar [27].

2.3.1.1.1. Aminopeptidazlar

Aminopeptidazlar, polipeptid zincirinin serbest olan N-terminalinde hareket eder ve tek bir amino asit kalıntısı, bir dipeptid veya bir tripeptid serbest bırakırlar. Heterolog olarak eksprese edilen proteinlerde bulunabilen fakat birçok doğal olgun proteinde bulunmayan N-terminaldeki metiyoninin koparılmasıyla bilinirler. Aminopeptidazlar, bakteriler ve mantarlar dahil olmak üzere çok çeşitli mikrobiyal türlerde ortaya çıkarlar. Genel olarak, aminopeptidazlar hücre içi enzimlerdir, ancak *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen bir hücre dışı aminopeptidaz da bildirilmiştir. *Escherichia coli*'den elde edilen Aminopeptidaz I, büyük bir proteazdır (400 kDa). Geniş bir pH optimumuna sahiptir (7,5-10,5) ve optimum aktivite için Mg^{2+} veya Mn^{2+} gerektirir. Bir lösin aminopeptidaz, çimlendirilmiş arpa tanelerinden (*Hordeum vulgare*) yaklaşık 670 kat saflaştırılmıştır. *Bacillus licheniformis* aminopeptidaz 34 kDa'luk bir molekül ağırlığına sahiptir. Aktivitesi Co^{2+} iyonları ile geliştirilmiştir. Benzer şekilde, başka bir tür *Bacillus* cinsi olan *B. stearothermophilus*, aminopeptidaz üretir. Yapısal olarak, molekül kütlesi yaklaşık 80 ve 100 kDa olan ve Zn^{2+} , Mn^{2+} veya Co^{2+} iyonları tarafından aktive edilen iki alt birimden oluşur [27].

Aminopeptidazlar, çok sayıda bitki türünden çeşitli dokularda tanımlanmış yaygın bulunan enzimlerdir, ancak yakın zamana kadar bunlardan sadece birkaçı saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bitki aminopeptidaz aktivitesinin büyüme ve

gelişmenin farklı aşamaları, tohum çimlenmesi, tohum ve meyve olgunlaşması, konakçı-patojen etkileşimleri, yaralanma süreçleri ve yaprak yaşlanması ile ilişkilendirildiği birçok çalışma bulunmaktadır. Bitki aminopeptidazlarının ayrıntılı bir incelemesi Walling ve Gu tarafından sağlanmıştır [28].

2.3.1.1.2. Karboksipeptidazlar

Karboksipeptidaz, polipeptid zincirinin C-terminal'ine etki eder ve tek bir amino asit veya bir dipeptidi serbest bırakır. Karboksipeptidazlar, enzimlerin aktif bölgesindeki amino asit kalıntılarının türüne bağlı olarak üç ana gruba ayrılır: serin karboksipeptidazlar, metalokarboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlar. *Penicillium sp.*, *Saccharomyces sp.* ve *Aspergillus sp.*'den izole edilen serin karboksipeptidazlar, substrat spesifikliğı açısından benzerdirler fakat optimum pH, stabilite, molekül ağırlığı ve inhibitörlerin etkisi gibi diğer özellikleri açısından bazı farklılıklar sergilerler. *Saccharomyces sp.* ve *Pseudomonas sp.*'den izole edilen metalokarboksipeptidazlar aktiviteleri için Zn^{2+} veya Co^{2+} iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Bu enzimler ayrıca peptidil grubunun bir pteroil veya açıl grubu ile yer değiştirdiğı peptidleri de hidrolizler [27].

Karboksipeptidazlar, bitki tohumlarında bulunan ana proteaz sınıflarından biridir, ancak mevcudiyeti olgun yeşil ve yaşlı yapraklarda da bildirilmiştir. Tohum karboksipeptidazları dikotiledonlu bitkilerin protein gövdelerinde ve çimlenen tahılların nişasta endosperminde bulunurlar. Tohum karboksipeptidazları aktif bölgelerinde serin bulundurmaları, pH 4-6 aralığında bir pH optimumuna sahip olmaları ve düşük spesifiklik gibi genel özelliklere sahiptirler. Ancak, bu izoenzimlerin çimlenme sonrası davranışları türe bağlı olarak değişkendir [28].

2.3.1.2. Endopeptidazlar

Endopeptidazlar, polipeptid zincirinin iç bölgelerindeki, N- ve C- terminallerinden uzak olan, peptid bağlarına olan spesifiklikleriyle karakterize edilirler. Serbest amino veya karboksil grubunun varlığı enzim aktivitesi üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir

[27]. Endopeptidazlar katalitik mekanizmalarına dayalı olarak Tablo 2.1.'de belirtilen dört alt gruba ayrılır [29].

Tablo 2.1. Proteazların başlıca özellikleri [29]

Sınıflandırma	Molekül kütlesi (kDa)	Optimum pH aralığı	Optimum sıcaklık aralığı
Aspartik proteazlar	30-45	3-5	40-55
Sistein proteazlar	34-35	2-3	40-55
Metaloproteazlar	19-37	5-7	65-85
Serin proteazlar	18-35	6-11	50-70

2.3.1.2.1. Serin proteazlar

Serin proteazlar aktif bölgelerinde bir serin grubunun varlığı ile karakterize edilirler. Serin proteazlar adındaki “serin”, bu enzim sınıfında katalitik bölgede yer alan serininin proteolize iştirakini ifade eder [31]. Serin proteazların tümü aktif bölgelerinde üç kalıntı içerir: bir serin, bir histidin ve bir aspartat. Bu üç kalıntı karakteristik katalitik triad’ı oluşturur. Serin proteazlar bilinen en büyük proteaz ailesidir [25]. Serin proteazlar virüsler, bakteriler ve ökaryotlar arasında yaygındırlar ve çok sayıda üyeye sahiptirler. Bu durum organizmalar için hayati önemde olduklarını gösterir. Serin proteazlar, ekzopeptidaz, endopeptidaz, oligopeptidaz ve omega peptidaz gruplarında yer alırlar. Serin proteazlar genellikle nötral ve alkali pH'larda aktiftirler ve pH 7 ve 11 arasında bir optimum pH’a sahiptirler. Esterolitik aktivite ve amidaz aktivitesi dahil olmak üzere geniş bir substrat spesifikliğine sahiptirler. Serin alkali proteazlar, çeşitli bakteriler (*Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Flavobacterium*), küfler, mayalar ve mantarlar tarafından üretilirler. Bu enzimler, parçalanacak bağın karboksil tarafında tirozin, fenilalanin veya lösin olan bir peptid bağını hidrolizler [26].

Serin proteazların ileri sınıflandırılması, önceden tanımlanmış proteazlarla yapısal homolojiye ve substrat spesifikliğine bağlıdır. Serin proteazların ana alt sınıfları;

subtilisin benzeri, kimotripsin benzeri, buğday serin karboksipeptidaz II-benzeri, proliligopeptidaz benzeri, miksobakter α -litik ve stafilokokal proteazlardır [26].

Yapısal ve katalitik olarak benzer proteazlar klanlar halinde gruplandırılır: dört ana klan, temsilci üyesi kimotripsin olan PA klanı, subtilisin içeren SB klanı ve çeşitli peptidazları içeren SC ve SF klanlarıdır. İnsanlardaki 178 serin proteazının kabaca %75'i ilk klana aittir. PA serin proteazlarının ana üç alt-familyası substrat spesifikliğine göre ayırt edilebilir. Tripsin benzeri serin proteazlar (bazı granzimleri ve triptaz içerir), protein substratları pozitif yüklü lizin ve arginin kalıntılarından sonra parçalarlar ve ilk olarak yiyecek sindirimindeki işlevleri için karakterize edilmişlerdir [31]. Kimotripsin benzeri aile üyeleri, protein substratları alanin ve lösin gibi büyük hidrofobik amino asitlerden sonra parçalar. Son olarak, elastaz benzeri serin proteazlar, protein substratları valin gibi küçük hidrofobik kalıntılardan sonra parçalarlar. Nötrofil elastaz (NE) ve proteinaz 3 (PR3) bu aileye aittir. Katepsin-G, bir serin proteazın birden fazla familyaya ait olabileceğini gösteren, kimotripsin benzeri ve tripsin benzeri substrat spesifikliğine sahiptir [25]. *Bacillus* kaynaklı subtilisinler serin proteazlar içerisinde geniş bir yer tutmaktadırlar. Subtilisin Carlsberg (*Bacillus licheniformis* tarafından üretilmiştir) ve Subtilisin Novo gibi alkali proteazlar veya bir bakteriyel proteaz olan Nagaz (BPN9, *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilmiştir) iyi tanımlanmış subtilisin-tip proteazlardır [24]. Bir başka serin proteaz olan trombin ve plazmin içeren trombin benzeri proteazlar en iyi pıhtılaşma ve iltihaplanmaya cevaptaki rolleri ile bilinirler [25].

Bitki serin proteazları 14 aileye ayrılır. Bu aileler, evrimsel olarak birbiriyle ilgisi olmayan 9 klana aittir. S8, S9, S10 ve S33 aileleri, her biri yaklaşık 60 üyeyi içeren, bitkilerin en büyük serin proteaz ailesidir. Serin proteazlar için çiçeklenme sonrası erken yaşlanma, azaltılmış tane ve tohum sayısı, bastırılmış hipersensitif hücre ölümü, sürgün sisteminin ablasyonu, yapısal hastalık direnci gibi biyolojik fonksiyonlar, bazı subtilazlar (SDD1 ve ALE1; aile S8, klan SB), karboksipeptidazlar (BRS1 ve SNG1/2; aile S10, klan SC) ve S1, S26 ve S14 familyalarının plastidlerde-lokalize olmuş üyeleri (DegPs, Plsp1 ve ClpPs) için belirlenmiştir [24].

Serin proteazların yıkıcı doğası göz önüne alındığında, çeşitli mekanizmaların aktivitelerini kontrol etmesi şaşırtıcı değildir. İlk olarak, serin proteazlar inaktif zimojenler olarak üretilir. Aktif olmak için, zimojenlerin parçalanması gerekir: örneğin katepsin C, Granzim A ve Granzim B'nin N-terminal pro-damainini parçalayıp çıkarır. Ayrıca proteaz aktivitesinin düzenlenmesinde lokalizasyonları da önemlidir. Çeşitli serin proteazlar proteoglikanlara bağlanmış granüllerin içinde depolanır, sitoplazmaya sızmaları ve hücresel hedefleri ile temasları önlenir. Ek olarak, granüllerdeki düşük pH bu enzimleri daha az aktif hale getirir. Son olarak, doğa, serin proteazların aktivitesini sınırlandıran özel bir serin proteaz inhibitör grubu (serpinler) geliştirmiştir. Serpinler, hedef proteazlarını tek bir “intihar” mekanizması ile inhibe ederek, proteazın geri dönüşümsüz kararlı bir kompleks içine hapsedilmesini sağlar [25].

2.3.1.2.2. Aspartik proteazlar

Yaygın olarak asidik proteazlar olarak bilinen aspartik asit proteazları, katalitik aktiviteden sorumlu yüksek oranda korunan iki aspartik asit kalıntısına sahip endopeptidazlardır. Bu iki aspartik asit kalıntısı proteoliz sırasında nükleofil olarak hareket eden bir su molekülünü destekler [24]. Omurgalılar, bitkiler, mayalar, nematodlar, parazitler, mantarlar ve virüsler arasında geniş bir dağılıma sahiptirler. Çoğu aspartik proteaz düşük pH'da (pH 3 ile 4) maksimum aktivite gösterir ve izoelektrik noktaları pH 3 ile 4,5 arasında değişmektedir. Pepstatin tarafından spesifik olarak inhibe edilirler [6]. Aspartik proteazlar, pepsin enzimine benzer şekilde, peptid bağının her iki tarafındaki aromatik veya hacimli amino asit kalıntılarına karşı spesifiklik sergilerler. Mikrobiyal aspartik proteazlar iki gruba ayrılabilir: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Neurospora* tarafından üretilen pepsin benzeri enzimler ve *Endothia* ve *Mucor* spp. tarafından üretilen renin benzeri enzimler. Bitkilerde sadece üç aspartik proteaz ailesi vardır, ancak bu aileler o kadar büyüktür ki aspartik proteazlar bitkilerde ikinci en büyük proteaz sınıfını oluşturmaktadırlar [24].

Bitkisel aspartik proteazlar, hücre dışı patojenezle ilişkili proteinlerin parçalanmasında ve kakao tohumlarının [32] ve hint fasüyesinin [33] globüler depolama proteinlerinin proteolizinde rol oynamaktadırlar. Bu enzimler, filizlenmemiş tohumlarda yaygındır, ancak tohumların çimlenmesi ve gelişimi sırasında aktivitelerinin gerekli olduğu kanıtlanmıştır [34, 35]. Bir aspartik proteazın domates yapraklarında sistemik bir yara cevap proteini olarak indüklendiği bulunmuştur [36]. Fitepsinler (bitki pepsin-tipi enzimler) aspartik proteaz grubuna aittir ve pepstatin tarafından genellikle inhibe edilir. Bunlar, kardinosinleri ve katepsin D benzeri proteinleri içerirler. Kardinosinler, *Cynara cardunculus*'un kurutulmuş çiçeklerinden elde edilen proteinlerdir ve Portekiz ve Batı İspanya'da koyun sütünden peynir üretimi için süt çöktürme enzimleri olarak kullanılırlar [37, 38]. Katepsin D benzeri aspartik proteazlar çimlendirilmiş tohumlarda, çimlenme sırasında ve aynı zamanda sürgünler ve kökler de dahil olmak üzere arpa tohumunun tüm canlı dokularında bulunmuştur [37, 39].

2.3.1.2.3. Sistein/Tiyol proteazları

Tiyol proteazları olarak da bilinen sistein proteazları hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Yaklaşık 20 sistein proteaz ailesi bilinmektedir. Bu proteazlar proteoliz sırasında nükleofil olarak katalitik bir sistein kullanırlar [24]. Tüm sistein proteazlarının aktivitesi, sistein ve histidin'den oluşan bir katalitik diad'a bağlıdır. Sistein proteazları nötral pH optimumuna sahiptir, ancak bunlardan birkaçı, örneğin lizozomal proteazlar, asidik pH'da maksimum aktivite sergilerler. Sistein proteazları, karboksilik asit türevlerinin, genel asit-baz oluşumu ve açıl-tiyol ara maddesinin hidrolizini içeren bir çift-yer değiştirme tepkimesi yoluyla hidrolizini katalizler. Yan zincir spesifikliklerine dayanarak dört gruba ayrılırlar; papain-benzeri, arginin kalıntılarından parçalama tercihli tripsin-benzeri, glutamik aside spesifik ve diğerleri. Papain en iyi bilinen sistein proteazıdır [27]. Sistein proteazlarının geniş bir sıcaklık ve pH aralığında aktif olma özelliklerinden dolayı gıda, biyoteknoloji ve ilaç endüstrilerinde büyük bir potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir. Sistein proteazları doğal bir şekilde farklı dokularda, bazı durumlarda aşırı miktarda üretildiklerinden, bitkiler sistein proteazlarının üretimi için

cazip bir alternatif haline gelmektedirler. Bitki kaynaklı papain benzeri enzimler; küçük boyutlu olma, geniş in vitro substrat spesifikliği, sistein proteaz inhibitörlerine karşı duyarlılık ve in vitro olarak tam aktivite için indirgeyici ajanlara ihtiyaç duyma ile karakterize edilen zimojenlerdir [6].

Sistein proteazlar, en iyi incelenen bitki proteazları arasındadır. Bitkilerde, sistein proteazların rol aldığı birçok biyolojik olay bildirilmiştir. Yaşlanma, mezofil hücrelerinin farklılaşması ve ksilojeniz, programlanmış hücre ölümü, çimlenme sırasında proteinlerin mobilizasyonu ve yaralanma bunlar arasındadır [28].

Sistein proteazları, papain ve kimopapain, karikain, bromelin, aktinidin, fisin, aleurain, memeli lizozomal katepsinler B, HL, S, C ve K'den oluşan bitki proteazlarını içeren bir enzim ailesini kapsar. Papain, aktinidin, proteinaz Ω , kimopapain, bromelin ve meksikain gibi çeşitli sistein proteazlar bir dizi bitki kaynağından izole edilmiştir. Çoğu papain ve legumain ailelerine aittir [6]. En iyi bilinen sistein proteazlar kaspaz-benzeri proteinler, vakulolar-işleme enzimleri, papain-benzeri peptidler ve katepsin-tipi proteazlardır.

Kaspazlar, memeli hücrelerinde programlanmış hücre ölümünün uygulanmasında merkezi bir rol oynamaktadır. Bu enzimler, peptidleri bir aspartik asit kalıntısından parçalama kabiliyetine sahiptir. Kaspaz benzeri aktivitenin ayrıca bitki apoptozisi ile ilişkili olduğu ve kaspaz spesifik inhibitörlerinin bakteri etkisiyle oluşan programlanmış hücre ölümünü ortadan kaldırdığı bildirilmiştir [28].

Vakulolar-işleme enzimleri, çeşitli vakuolar proteinlerin olgunlaşmasından sorumludur ve birçok bitki organında yaygın olarak dağılmıştır. Vakulolar-işleme enzimleri sisteminin ekspresyonunun analizi, bu enzimlerin tohumlarda depolanmış proteinlerin olgunlaşmasında ve litik vakuoldaki yaşlanmaya bağlı hidrolitik enzimlerin aktivasyonunda rol oynadığını ve dolayısıyla hücreleri ölüm için hazırladığını göstermektedir [28].

Papain benzeri peptidazlar, sistein proteazlarının en kapsamlı şekilde araştırılmış ailesidir. Bu enzimler, zimojenler olarak sentezlenirler ve tam aktivite için indirgeyici maddelere gereksinim duyarlar, geniş substrat spesifikliğine sahiptirler [28].

Yoğun olarak çalışılan bir başka sistein proteaz grubu, katepsin-tipi proteazlardır. Katepsinler, tüm memeli hücre tiplerinde bulunan lizozomal glikoproteinlerdir. Bu proteazlar çok çeşitli küçük peptidlere ve büyük protein substratlarına karşı aktiftir ve farklı katalitik mekanizmalar gösterirler: katepsin R bir serin-proteaz, katepsinler D ve E aspartik proteazlar iken, katepsin B, K, H, N, S, M ve T sistein proteazlardır [28].

2.3.1.2.4. Metaloproteazlar

Bu proteazlar, en geniş çeşitliliğe sahip katalitik tipteki proteazları içerirler. Aktiviteleri için iki değerlikli bir metal iyonu gereksinimi ile karakterize edilirler. Metaloproteazların içerdikleri bu katalitik metal iyonları oksianyon deliğinin stabilizasyonu esnasında suyu nükleofilik atak için aktive ederler [24]. Söz konusu metal iyonu ise çoğunlukla çinko, kobalt veya mangandır [6].

Metaloproteazlar, yüksek yapıli organizmalar ve yılan zehiri hemorajik toksinleri kaynakli kolajenazlar ve bakteri kaynakli termolizin gibi çeşitli kökenlerden elde edilen enzimleri içerirler. Aktivitelerinin spesifikliğine bağıli olarak metaloproteazlar nötral, alkali, Mikrobakter I ve Mikrobakter II olmak üzere dört gruba ayrılabilirler. Nötral proteazlar hidrofobik amino asitlere spesifiklik gösterirken, alkali proteazlar çok geniş bir spesifikliğe sahiptir [27].

Farklı proteaz tipleri içerisinde metaloproteazlar hem yapı hem de fonksiyon açısından en farklı olanlardır. Diğer proteaz türleri ile karşılaştırıldığında, bitki metaloproteazları hakkında nispeten az şey bilinmektedir [6]. Bitki metaloproteazları nodülasyon, plastid farklılaşması, termotolerans, kök ve sürgün meristem boyutunun regülasyonu, oksin konjugatlarına duyarlılık ve mayoz bölünme ile ilişkilidir [24].

Lösin aminopeptidazlar, büyük ölçüde N-terminal amino asit kalıntısından etkilenen ve bitkilerde protein yarı ömrünün düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen, yaygın bulunan metaloproteazlardır. Tüm bitki türlerinde yapısal olarak mevcuttur [6]. Matriks metaloproteazlar, hücre dışı matriks proteinlerinin parçalanmasında rol oynayan bir dizi hayvan endopeptidazı içerir. Hayvansal matriks metaloproteazlarla elde edilen sonuçlar, bitki enzimlerinin büyüme ve gelişmenin önemli düzenleyicileri olabileceğini ve hatta bitkilerde programlanmış hücre ölümü sürecine katılabileceğini düşündürmektedir [28].

2.3.2. Faaliyet gösterdikleri pH aralığına göre proteazlar

2.3.2.1. Asidik proteazlar

Asidik proteazlar düşük pH değerlerinde etkilidirler ve peptid bağının her iki tarafındaki aromatik amino asitleri içeren hacimli yan zincirlerden parçalamaya etki ederler [29].

2.3.2.2. Nötral proteazlar

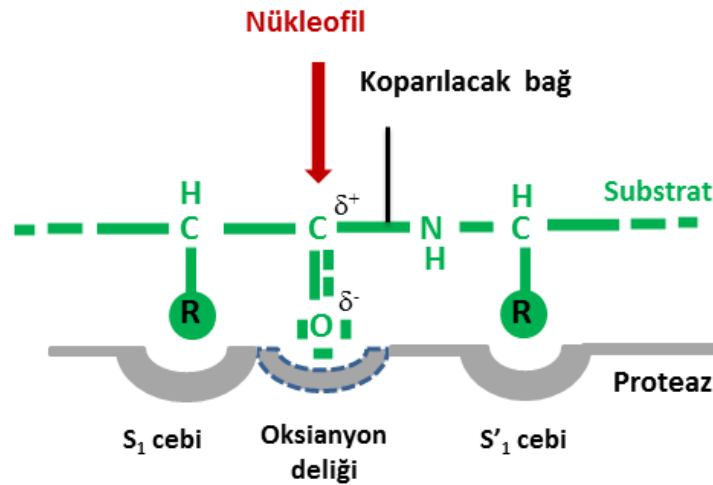
Nötral proteazlar pH 5-8 aralığında aktiftirler ve hayvan kaynaklı proteazlara göre daha az acılığa sahip protein hidrolizatlarını üretme özelliğine sahiptir, bu özellikleri gıda endüstrisi için önemli bir uygulama olanağı sunmaktadır. Bu proteazlar, hidrofobik amino asitler için yüksek afiniteye ve düşük termal toleransa sahiptir. Bu durum, reaksiyon kontrolü ve düşük hidroliz derecesine sahip hidrolizatların üretilmesi için spesifik koşulların oluşturulması açısından bir avantajdır [29].

2.3.2.3. Alkali proteazlar

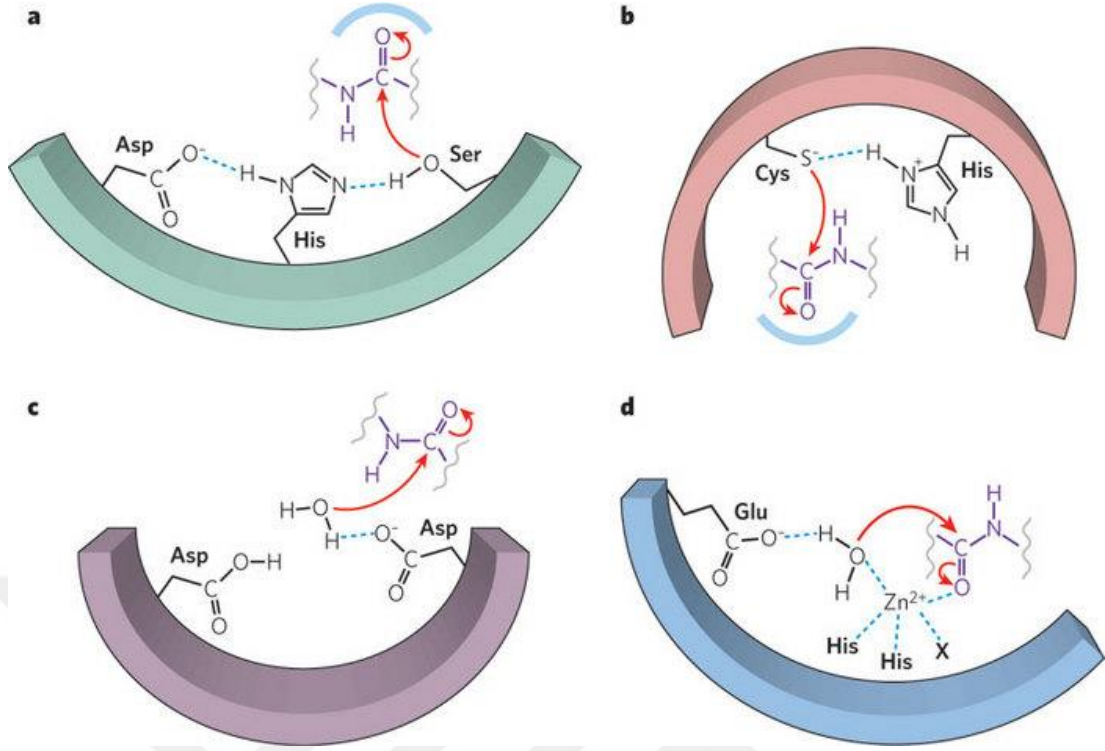
Alkali proteazlar pH 10 civarlarında bir optimum pH'a sahiptirler ve pH 7 ile 11 arasında değişen alkali pH'larda aktivite göstermektedirler. Bu enzimler, tirozin, fenilalanin, lösin (terminal karboksil grubuna yakın), aspartat, histidin ve serin (aktif bölgelerinde) içeren bağları hidrolizleyebilirler [29].

2.4. Proteaz Reaksiyon Mekanizması

Proteazlar, bir peptid bağına nükleofilik atak ve bu atakı izleyen bir tetrahedral ara madde hidrolizi ile geri dönüşümsüz olarak hidrolizler. Proteazlar çoğunlukla aktif bölgedeki anahtar katalitik gruba göre gruplandırılırlar: serin (Ser), sistein (Cys), aspartat (Asp) veya metaloproteazlarda bir metal iyonu (çoğunlukla çinko). Ser ve Cys bir amid karbonil karbonuna saldıran nükleofiller olarak doğrudan etki gösterirken, Asp ve metaloproteazlardaki metal iyonu sonrasında bir nükleofil olarak hareket etmek üzere bir su molekülünü aktive ederler [30]. Serin proteazların katalitik mekanizması sistein proteazlara çok benzer ve hatta bazı serin proteazlar evrimsel olarak sistein proteazlar ile akrabadırlar. Tüm proteazlar, bir oksianyon deliğindeki oksijeni stabilize ederek substrat peptid bağının karbonil grubunu polarize ederler, bu da karbon atomunu aktive edilmiş bir nükleofil tarafından saldırıya karşı daha savunmasız hale getirir (Şekil 2.1.). Proteazlar bunu dört ana yolla yapabilir, bu dört ana yol dört katalitik sınıfa isimler verir: sistein proteazlar, serin proteazlar, metaloproteazlar ve aspartik proteazlar (Şekil 2.2.) [24].



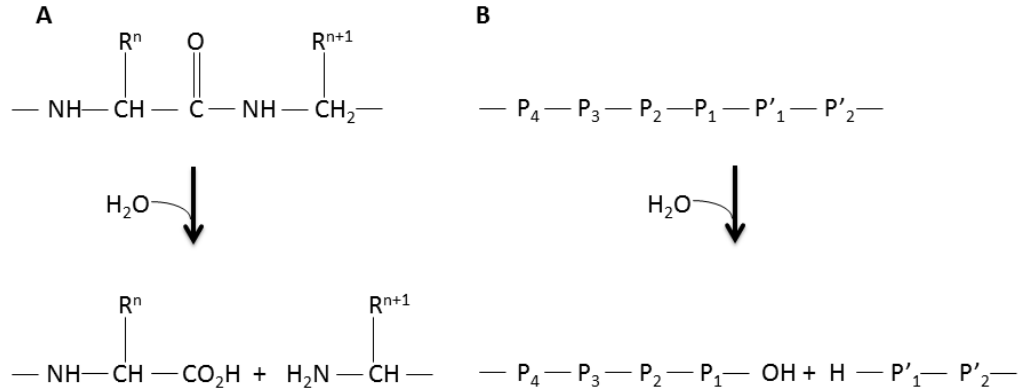
Şekil 2.1. Proteaz enzimlerinin parçalama mekanizması. Protein substrat (yeşil), enzimin substrat cepleriyle (S) etkileşime girerek, proteazın substrat bağlanma bölgesine (gri) amino asit kalıntıları (R) vasıtasıyla bağlanır. Oksianyon deliğinin (mavi) stabilize edilmesi yoluyla enzim tarafından polarize edilen karbonil grubu, koparılabilir peptid bağına bitişiktir. Bu durum, nükleofilik saldırı için karbonil karbonunu savunmasız hale getirir [24].



Şekil 2.2. Dört ana katalitik proteaz sınıfının parçalama mekanizmaları. Serin ve sistein proteazlarının aktif bölgelerinde, anonim kalıntı genellikle, peptid bağı üzerinde nükleofilik saldırıyı teşvik etmek için bir proton-çeken grup ile eşleştirilir. Aspartik proteazlar ve metaloproteazlar, enzimin kendisinin bir fonksiyonel grubunu kullanmak yerine, nükleofil olarak hizmet etmek üzere bir su molekülünü aktive eder. Bununla birlikte, genel peptid bağlanması işlemi, tüm proteaz sınıfları için esasen aynıdır. Çözünür serin proteazlar (a); sistein proteazlar (b); aspartik proteazlar (c); ve metaloproteazlar (d) [40].

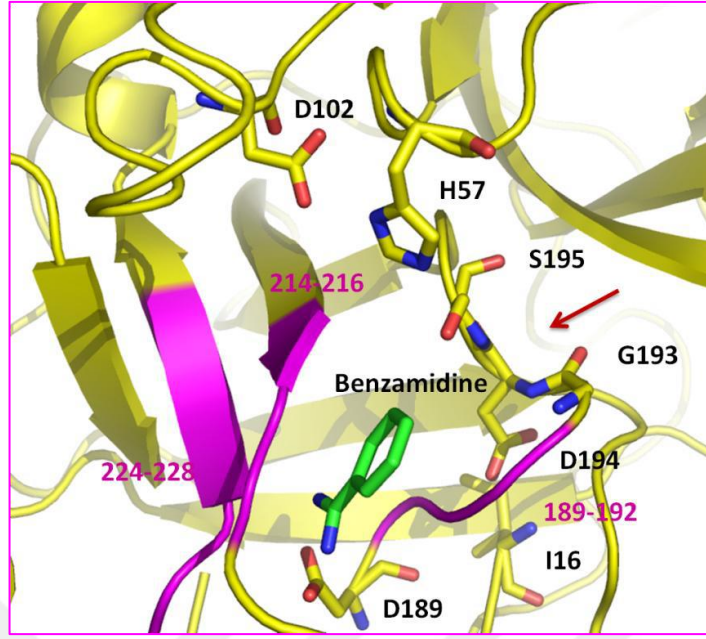
2.4.1. Serin proteazların katalitik etki mekanizması

Bir serin proteazın aktif bölgesine bir substrat bağlanıp yıkıma uğradığında, substratın N-terminal kısmı serbest kalır. Sonra bir su molekülü bağlanır ve substratın C-terminal kısmı serbest bırakılır. Bağı N-terminal tarafındaki kalıntılar P1, P2, P3 vs. olarak adlandırılırken, C-terminal tarafındaki kalıntılar P1', P2' P3' vs. olarak adlandırılmıştır. Proteaz üzerindeki komplementer substrat bağlanma bölgeleri S1, S2, S3 ve S1', S2', S3' vs. olarak adlandırılmıştır. Tripsin benzeri proteazların substrat spesifikliğı genellikle P1-S1 etkileşimi ile karakterize edilir (Şekil 2.3.) [41].



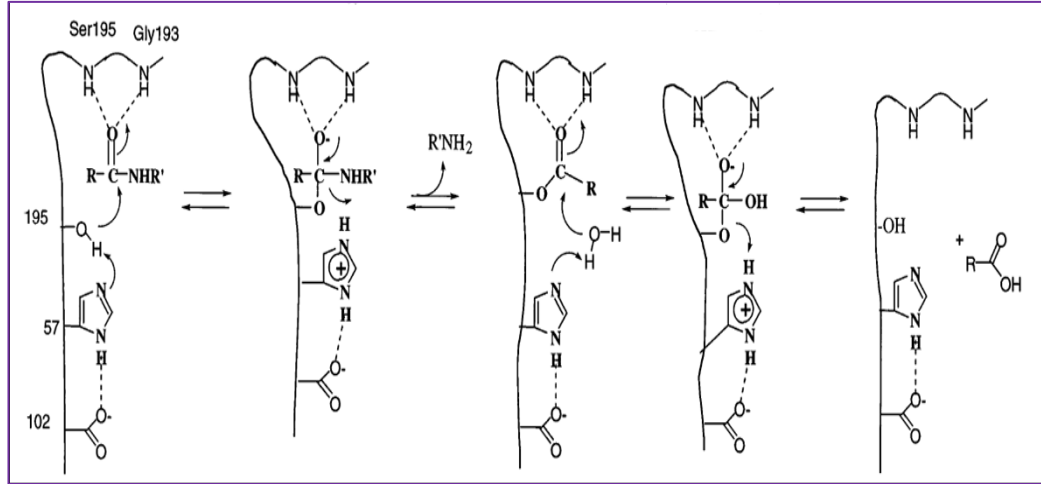
Şekil 2.3. (A) Bir peptid bağının proteaz enzimi ile hidrolizi. Genel peptid hidrolizlenir ve serbest bırakılır. (B) Koparılabilir bağa göre substrat üzerindeki pozisyonları ve proteazı tarif eden terminoloji [41].

Şekil 2.4.'de gösterilen tripsin benzeri serin proteazların genel yapısı, iki altı-dizili anti-paralel β -varil içinde düzenlenmiş yaklaşık 245 kalıntıdan oluşur ve iki β -varil arasında katalitik triad kalıntıları bulunur. Aktif merkez üç bölümden oluşur: S1 spesifiklik cebi, katalitik triad ve oksianyon deliği. Katalitik triad, substrat hidrolizini katalizleyen Asp102-His57-Ser195 tarafından oluşturulur. Oksianyon deliği, tetrahedral ara maddenin negatif yükünü stabilize etmek için pozitif yük sağlayan Ser195 ve Gly193 tarafından oluşturulur. Tripsin benzeri serin proteazlarda, S1 cebi normal olarak 189-192, 214-216 ve 224-228 kalıntılarından oluşur. Asp189, S1 cebinin alt kısmındadır ve Gly216 ve Gly226 ile birleşerek, substratın P1 bölgesindeki Arg veya Lys spesifikliğınden sorumlu olan negatif yüklü bir S1 cebi oluşturur [41].



Şekil 2.4. Tripsin benzeri serin proteazın üç boyutlu yapısı. Katalitik triad kalıntıları, oksianyon deliği (kırmızı ok) ve spesifiklik cebi (D189) çubuklar olarak gösterilmiştir. N-terminal (Ile16) ve D194 bir tuz köprüsü oluşturur. S1 cebi 189-192, 214-216 ve 224-228 kalıntılarından (pembe renkle gösterilmiştir) oluşmaktadır. İnhibitör p-aminobenzamidin (yeşil) S1 cebine bağlanır [41].

Şekil 2.5.'de verilen katalitik mekanizmaya göre; bir substrat serin proteazın aktif bölgesine yaklaştığında, Ser195'in hidroksil O atomunun bir substrat peptid bağının karboniline saldırısı ile hidroliz başlatılır. His57 bir baz olarak hareket eder ve Ser195'in hidroksil grubunun protonunu kabul eder. Bu arada His57-H⁺ Asp102 ile stabilize edilir. Gly193 ve Ser195'teki omurga NH'leri, P1 kalıntısından karbonil oksijen atomunu stabilize eden, oksianyon deliği olarak adlandırılan, pozitif yüklü bir cep üretir. Sonuç olarak, bir tetrahedral ara ürün oluşur. Daha sonra, tetrahedral ara ürünü, protonu His57'den, bir açıl-enzim ara ürününü ve substratın N-terminal kısmını serbest bırakan P1 kalıntısına iletmesiyle bozulur. Hemen su molekülü, His57'deki peptid fragmentinin yerini alır. Sudaki hidroksil O atomu, P1 karbonil üzerinde nükleofilik bir saldırı yapar ve ikinci tetrahedral ara ürün oluşur. Sonunda, ara madde, C-terminal substrat fragmentini üretmek için yıkılır ve aktif bölge rejenere olur [41].

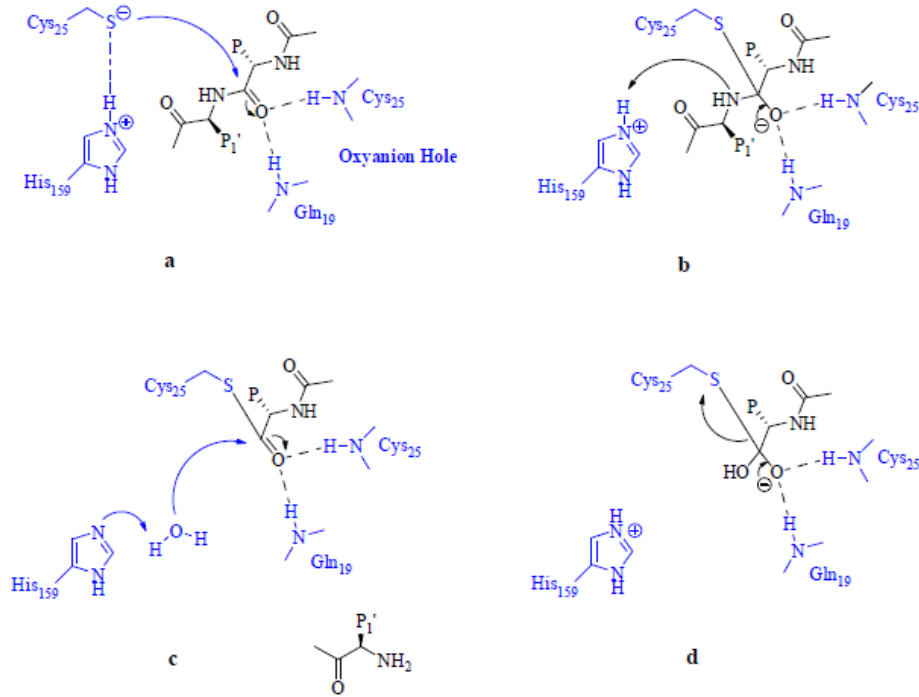


Şekil 2.5. Serin proteazların katalitik mekanizması [41]

2.4.2. Sistein proteazların katalitik etki mekanizması

Sistein proteazlarının aktif merkezi, peptid bağı hidrolizinden sorumlu bir katalitik triad (Cys, His ve Asn) ve enzimin alt bölgeleri ile substratın amino asit kalıntıları arasındaki etkileşim yoluyla meydana gelen kataliz için substrat yönlenmesinin gerçekleştiği alt bağlanma ceplerinden oluşur.

Katalitik triadın sistein ve histidini, sistein tiyolü üzerinde yüksek nükleofiliklik sunan bir tiyolat-imidazolyum iyon çifti oluşturur. Bu koşullar altında, sisteinin tiyol grubu substrat peptid bağına hidrolizlemek için bir nükleofil olarak görev yapar. Şekil 2.6.'da gösterilen substrat hidrolizinin genel mekanizması dört adımda gerçekleşir. İlk tetrahedral ara ürün (b), oksiyanyon deliğini (a) meydana getiren Cys25 ve Gln19'a hidrojen bağıyla bağlanarak stabilize edilir. Ardından enzim açillenir ve C-terminal substrat fragmenti serbest bırakılır. Açıl-enzimin hidrolizi, ikinci bir tetrahedral ara ürünü oluşturur (c). Bu ara maddenin yıkımı, serbest enzimi rejenere eder ve N-terminal substrat fragmenti (d) serbest bırakılır [42].



Şekil 2.6. Sistein proteazlarının önerilen hidroliz mekanizması (enzim kalıntıları mavi renkle işaretlenmiştir) [42]

2.4.3. Aspartik proteazların katalitik etki mekanizması

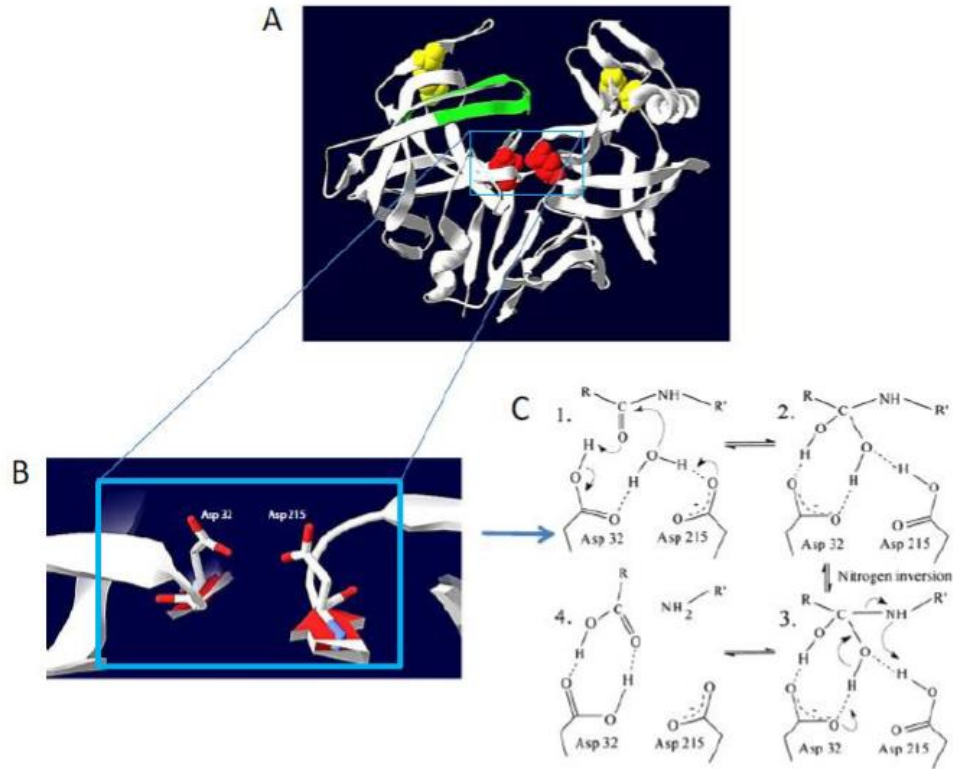
Genellikle 320 ile 340 amino asit kalıntısından oluşan aspartik asit proteazlarının molekül ağırlığı tipik olarak 35 ile 50 kDa arasında değişir. Bu enzimler, 3 ile 4,5 aralığında değişen izoelektrik nokta değerlerine sahiptirler. X-ışını kristalografisi ile çeşitli aspartik proteazların analizi, bu proteazların çoğunlukla β -iplikli ikincil yapılardan oluştuğunu göstermektedir. β -iplikli yapılar aktif bölge yarığının tabanında bulunur ve katalitik aspartik kalıntıları içerirler. Her iki aspartat karboksili arasında hidrojen bağlarıyla bağlı halde bir su molekülü bulunur. Bu su molekülünün katalitik mekanizmaya katıldığı düşünülmektedir. İlginç bir şekilde, bu yapılar globüler proteinlerde gözlemlenen en büyük β -iplik yapılarını temsil etmektedirler. Aspartik proteazların çoğunun, aktif bölgelerini tamamlayan β -kıvrımlarından oluşan en az bir kanat bölgesi olduğu bilinmektedir. Kanat bölgesi Şekil 2.7.'de yeşil renkle gösterilmiştir. Kanatlar, katlandıktan sonra tüm bileşenlerin doğru geometriye sıkışmasını sağlayan ve substratı, katalitik sürecin başlamasını sağlayacak şekilde yerinde tutan bir mekanizma görevi görür. Aspartik proteazların iyi bilinen örnekleri arasında rennet, katepsin D, katepsin E ve pepsin bulunur. Protein Veri Bankası

(PDB) veri tabanı, aspartik proteazlar içindeki sekiz alt aileyi aktif bölgelerindeki Asp- Thr (Ser) -Gly dizisiyle sınıflandırır. Alt aileler, katalitik bölgelerinin konumuna, aktif bölgelerindeki spesifik kalıntılara, yapı içinde bulunan disülfid köprülerinin sayısına ve enzimin aktivite gösterdiği optimum pH'a göre farklılık gösterirler [43].

Veerapandian ve ark., gerçekleştirdikleri inhibisyon çalışmasına dayalı olarak aspartik proteazlar için bir katalitik mekanizma önermişlerdir (Şekil 2.7.). Bu katalitik mekanizmaya göre aspartik proteazlar, aspartik kalıntılardan birinin (Asp32) proton kabul eden bir baz, diğerinin (Asp215) proton veren bir asit gibi davranması neticesinde meydana gelen genel asit-baz katalizi ile aktivitelerini gerçekleştirirler. Başka bir deyişle, ilk kalıntı nispeten düşük bir pKa değerine ve ikincisi nispeten yüksek bir pKa değerine sahiptir. Şekil 2.7. A ve B, tipik bir aspartik proteazın üç boyutlu yapısını göstermektedir ve Veerapandian ve ark. tarafından önerilen moleküler etki mekanizmasını (Şekil 2.7. C) detaylandırmaktadır. Düşük pH'a maruz kalmanın ardından, kırılma olayları konformasyonel yeniden düzenlemeye yol açar. İlk olarak, bir su molekülü hidrojen bağlarıyla iki aspartik kalıntıya bağlanır ve koparılacak peptid bağının karbonil karbonuna saldıran bir nükleofil olarak işlev görür. Bir baz olarak hareket eden aspartik kalıntı, su molekülünden bir protonu uzaklaştırır ve bunu, su molekülünün substratın koparılacak peptid bağının karbonil karbonuna nükleofilik saldırısı izler. Aynı zamanda, bir asit olarak işlev gören diğer aspartik asit kalıntısı, peptid bağı karbonilinin oksijen atomuna bir proton verir. Bu, tetrahedral bir ara ürün oluşmasına yol açar. Böylece, bir baz olarak davranan aspartik kalıntı, saldıran oksijen atomuna hidrojen bağıyla bağlarken, bu oksijen üzerinde kalan hidrojen, bir asit gibi davranan aspartik kalıntının oksijenine hidrojen bağıyla bağlıdır. Son aşamalarda, baz görevi gören aspartik asit kalıntısından bir hidrojen atomunun substratın koparılacak peptid bağının azot atomuna transferi ile azot atomu etrafında konfigürasyon tersine çevrilir. Bu çevrilmenin paralelinde, asit olarak etki eden aspartik asidin oksijen atomundan, parçalanacak peptid bağı karbonil oksijenine bir proton aktarılır. Bu, C-N bağının parçalanmasına ve iki peptid ürününün serbest bırakılmasına yol açar. Sonuç olarak, baz olarak davranan aspartik

asit bu aşamada negatif yükle yüklenir ve böylece bir sonraki kataliz için hazırdir [43].

2001 yılında Northdrop, yukarıda tarif edilen aynı prensibe dayalı bir alternatif mekanizma önermiştir, fakat burada, katalitik bölgede bulunan iki aspartik kalıntı arasında bir düşük bariyer hidrojen bağı (eski önerilen mekanizmada mevcut değildir) oluşturulmuştur. Bir başka önemli fark, son adımın bir su molekülünün bağlanmasını ve düşük bariyer hidrojen bağının yeniden oluşmasını içermesidir. Ancak, bu öneriyle ilgili, aspartik kalıntıların iki iç oksijeni arasındaki açının hidrojen bağı oluşumu için çok geniş olmasına dayanan anlaşmazlıklar olmuştur. Bununla birlikte, tüm yazarlar kovalent bir ara maddenin oluşumu üzerinde hemfikirdir [43].



Şekil 2.7. Tipik bir aspartik proteazın üç boyutlu yapısı ve etki mekanizması. *Candida tropicalis*'ten salgılanan aspartik proteinaz, bu görüntülerin Swiss-PDBViewer (v4.0.4.) ile görselleştirilmesi için kullanılmıştır. A: Yapısal elemanların gösterimi: aktif merkez (kırmızı), disülfid bağları (sarı) ve kanat bölgesi (yeşil). B: Aktif merkez oyununun yakından görünümü. C: Veerapandian ve ark. tarafından önerilen modele göre, Coates ve ark. tarafından temsil edilen katalitik mekanizma [43].

2.4.4. Metaloproteazların katalitik etki mekanizması

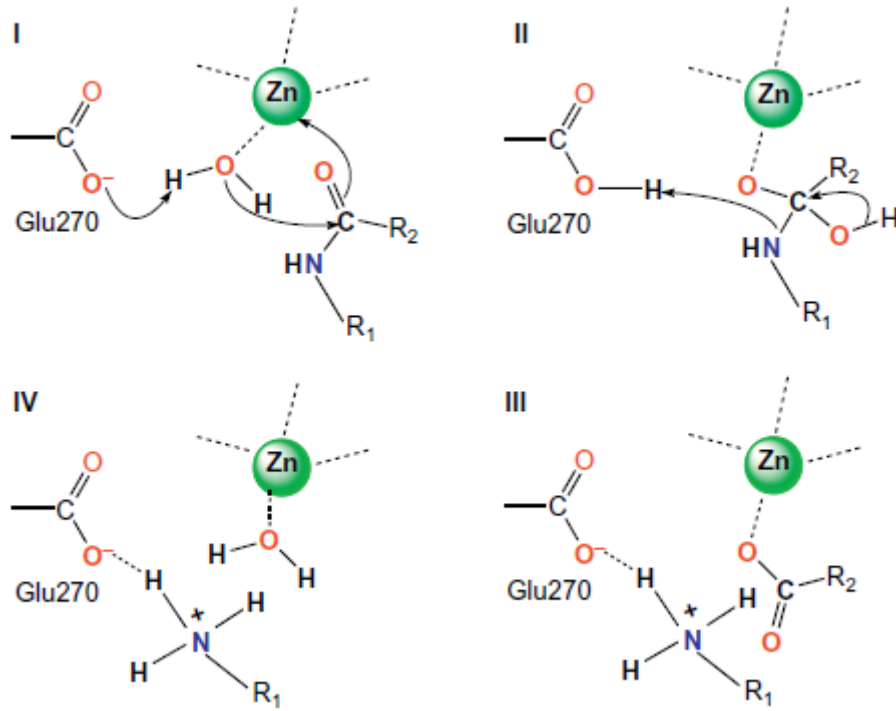
Metaloproteazların hepsi aktif merkezlerinde enzim mekanizmasında yer alan bir metale sahiptir. Bazı metaloproteazlar kobalt içerirse de, aktif merkezdeki bu metal çoğunlukla çinkodur. Bu nedenle, bu enzim grubunun işlevi çok yönlü olan çinkonun kimyası ile ilgilidir. Çinko, kompleks oluştururken çok çeşitli koordinasyon sayıları ve geometrileri barındırmasına olanak tanıyan dikkat çekici şekilde uyarlanabilir bir koordinasyon küresine sahiptir. Çinko, protein yan zincirlerine bağlandıktan sonra pozitif bir yüke sahipse, katalizde bir Lewis asidi olarak davranabilir. Çinko bağlı su hidroksite dönüştürülürse, çinko bölgesi katalizde bir baz veya nükleofil olarak davranabilir. Bu anlamda katalitik çinko bölgeleri amfoteriktir. Komşu geçiş metallerinin yükseltgenme/indirgenme özellikleri, onların ligand/değişim oranları, amfoterik özellikleri ve koordinasyon geometrilerinin önemli bir sebebidir. Çinko, dolu bir d-kabuğuna sahip olduğu için yükseltgenme/indirgenme özelliğine sahip değildir, böylece redoks potansiyeli sürekli değişen bir biyolojik ortamda stabil bir metal iyonu türü sağlar [44].

Tüm metaloekzo- ve metaloendoproteazların işlevi, bir peptid bağı boyunca bir su molekülünün eklenmesini katalizlemektir. Reaksiyonun ürünü, nötral pH değerlerinde protonlanmış bir amin ve bir iyonize karboksilat grubudur. Reaksiyon için gereken enerji, oluşan aminin pKa değerinin amino-, karboksi- ve endopeptidazların ürünleri için biraz farklı olması nedeniyle, peptid bağı tipiyle bir miktar değişmektedir [44].

Çinko proteazlarının şimdiye kadar yapısal olarak karakterize edilen katalitik bölgeleri, ya 3 His ligandını ya da 2 His ligandını ve üçüncü ligand olarak 1 Glu/Asp'i içermektedir. Her durumda yaklaşık 4 ile 5 Å arasında bir ilave asit/baz katalizörü, genellikle bir glutamat kalıntısı, bulunmaktadır. Karboksilatın metalden uzaklığı, metal-bağlı suyla hidrojen bağı yapmış bir iyonize karboksilat oksijeninin etkileşimi ile tutarlıdır. Bu nedenle bu Glu kalıntısının rollerinden biri küçük anyonların, metal-bağlı suyun yerini değiştirme yeteneğini azaltmak olabilir. Bu karboksilat, genel bir asit/baz veya nükleofil olarak ya da geçiş halini stabilize ederek

katalize de katılabilir. En kapsamlı olarak incelenen metaloproteazlar, karboksipeptidaz A ve termolizindir. Bu durumun karboksipeptidaz A için geçerli olduğu kanıtlanmıştır. Karboksipeptidaz A metaloproteazı, 2 His1Glu/Asp katalitik bölgesi üzerine en iyi çalışılan örnektir [44].

Karboksipeptidaz A ve termolizin benzeri proteazlar için önerilen katalitik mekanizmanın birinci aşamasında (I), Glu270, metal bağlı sudan bir proton kopararak genel baz katalizörü olarak görev yapar ve metal bağlı hidroksitin bir peptid karboniline saldırmasına izin verir. Arg127 geçiş halinde negatif yükü dengelemede rol oynar. Arg145, Asn144 ve Tyr248 gibi diğer aktif bölge kalıntıları, substrat karboksil grubunun bağlanmasında rol oynarlar ve böylece substratın kataliz için konumlandırılmasına yardımcı olurlar. Bir sonraki aşamada (II), Glu270 ayrılan amine proton vererek bir genel asit katalizörü olarak görev yapar ve metalle bağlanmış tetrahedral ara madde ürünü oluşturur (III). Son aşamada (IV), N-terminali ürün ayrılır ve su C-terminali ürünüyle hala bir tuz köprüsü şeklinde Glu270'e bağlanan metale geri döner. Enzim kompleksi böylelikle ters reaksiyon yani peptid bağı sentezi için hazır olur. Bu durumda çinko-bağlı su, suyun anyonlarla yer değiştirmesine karşı savunmasızdır. Ürün komplekslerinin X-ışını soğurumlu ince yapı çalışmaları, III ve IV enzim ara maddeleri için yapısal kanıt sağlamaktadır (Şekil 2.8.) [44].



Şekil 2.8. Karboksipeptidaz A ve termolizin benzeri proteazlar için önerilen katalitik mekanizma [44]

2.5. Proteazların Endüstrideki Uygulama Alanları

Fizyolojik önemine ek olarak proteazlar, çamaşır deterjanları, bulaşık yıkama makinesi deterjanları, yem katkı maddeleri, gıda hazırlama, deri, teşhis-tedavi ve farmasötik endüstriler gibi endüstriyel enzimatik uygulamalarda büyük bir kullanım alanına sahiptirler [26]. Proteinlerin kimyasal, fiziksel, biyolojik ve immünolojik özelliklerini değiştirmeleri nedeniyle biyoteknolojide önemli bir rol oynayan proteazlar, dünya enzim pazarında ilk sıralarda yer almaktadır [6]. Gıda endüstrisinde proteazların başlıca kullanımı, süt, et ve balık ürünlerinde aroma geliştirilmesidir. Deri ve yün endüstrisinde proteazlar yün lifleri üzerindeki örtüşen alanların hidrolizi, kıl giderimi ve tavlama (rutubetlendirme) gibi uygulamalara sahiptirler. Proteazlar farklı tıbbi tedavilerde aktif ajanlar olarak kullanılırlar (osteoartrit tedavisi, ölü dokunun çıkarılması, yara iyileşmesi, vb.) [26].

Bitki özütlerinden elde edilen enzim preparatları, enzimlerin doğası ve özellikleri hakkında çoğu şeyin bilinmediği zamanlardan beri endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır. Ticari enzimlerin büyük çoğunluğu temel olarak mikrobiyal kaynaklardan elde edilmiştir, ancak endüstriyel prosesler, biyoteknoloji ve farmakoloji uygulamalarıyla bitki enzimleri giderek daha önemli hale gelmektedir. Son yıllarda, bitki doğal ürünlerine olan ilgi hızla artmıştır. Endüstriyel proseslerde kullanılan bitkisel kökenli enzimler sayıca hala azdır fakat sayıları hızla artmaktadır. En yaygın olarak kullanılan bitki proteazları, sırasıyla *Carica papaya*, *Ananas comosus* ve *Ficus carica*'dan ekstrakte edilen papain, bromelin ve fisindir. Bu proteazlar, farklı endüstriyel süreçlerde ve tıpta kullanılmaktadırlar. Papain benzeri proteazların bir kısmı gıda endüstrisinde peynir, bira ve meşrubat endüstrileri için yüksek çözünürlükte ve aromatik protein hidrolizatlarının hazırlanmasında, bir gıda tamamlayıcısı olarak etlerin yumuşatılmasında ve emülgatörlerin üretiminde kullanılmaktadır. Diğer endüstrilerdeki kullanımları arasında; kültür ortamı formülasyonu, genetik materyalin izolasyonu ve deri endüstrisinde kıl giderme ve tabaklama aşamalarında keratinazların kullanımı bulunmaktadır. Ayrıca, lizin gibi esansiyel amino asitlerin üretiminde ve atık su sistemlerinin tıkanmasının önlenmesinde kullanılırlar [6].

2.5.1. Çamaşır deterjanı endüstrisi

Proteazlar, modern çamaşır deterjanlarının temel bileşenlerindendirler. Tripsin ve kimotripsin formundaki proteazlar ilk defa 1913 yılında Alman kimyacı Otto Röhm tarafından proteinli lekelerin parçalanması için çamaşır deterjanlarında aktif bir bileşen olarak tanıtılmıştır. Bakteriyel proteazları içeren ilk ticari deterjan olan BIO-40, 1956'da Gebrüder Schnyder tarafından üretilmiştir. 1960 yılında, Novo Industria A/S tarafından üretilen *Bacillus licheniformis* alkalaz, BIOTEX adı altında pazara girmiştir. 1985'te, Avrupa'daki ağır hizmet çamaşır deterjanlarının yaklaşık %70'i enzimler içermektedir. Son 50 yılda, çamaşır deterjanlarındaki proteazlar ve diğer enzimler, küçük katkı maddeleri olmaktan çıkıp temel katkı maddelerine dönüşmüşlerdir. Proteaz üretiminde, fermentasyondan sonra elde edilen sıvı süpernatant proteazları içeren kaynaktır, bu sıvı deriştirilir ve kurutulur. Deterjan

bileşiminde bulunan toz formundaki proteazlar, enzimatik deterjanlarda bulunan ve kullanıcıyı istenmeyen proteaz tozlarının solunmasından koruyan karakteristik balmumu içeren granüller olarak hazırlanırlar [26, 29].

Deterjanlarda kullanılacak proteazların seçimi ve değerlendirilmesi, çamaşır deterjanı üreticileri tarafından tanımlanan önemli parametrelere dayanmaktadır. Bir deterjan proteazının, geniş alkali pH'da ve geniş bir sıcaklık aralığında (sentetik elyaflar için düşük sıcaklıklardan, pamuk için yüksek sıcaklıklara kadar) etkili bir yıkama performansına sahip olması gerekir. İyi bir deterjan proteazının performansı, proteinli lekenin bozunması, diğer deterjan bileşenleriyle (örneğin noniyonik ve anyonik yüzey aktif maddeler, kompleksleştirici maddeler, parfümler ve diğer enzimler) uyumluluk, ağartıcı olarak kullanılan oksitleyici maddelerin varlığında kararlılık ve deterjan formülasyonlarındaki raf ömrü gibi birçok parametre ile tanımlanır. Önde gelen enzim tedarikçileri ve deterjan üreticileri daha iyi temizlik, kumaş bakımı ve antimikrobiyal özellikler gibi tüketici ihtiyaçlarını karşılayan yeni enzimler için aktivite geliştirme çalışmalarını aktif olarak sürdürmektedirler. Sıcaklık, pH, kararlılık ve substrat spesifikliği açısından daha güçlü olan proteazların üretiminde protein mühendisliği tekniklerinden de yararlanılmaktadır [26].

Alkali proteazlar (örneğin subtilisin) oldukça alkali pH değerlerinde aktivite gösterebildiklerinden deterjanlarda kullanım için uygundurlar. Son 30 yılda, çamaşır deterjanı endüstrisinde subtilisin benzeri proteazlar sıklıkla kullanılmaktadırlar. Subtilisin benzeri proteazlar, 18 ile 90 kDa arasında değişen molekül ağırlığına sahip hücre dışı enzimler olarak üretilen serin proteazlardır ve esas olarak yüksek kararlılık ve geniş substrat spesifikliği gibi üstün özellikleri nedeniyle endüstride kullanılmaktadırlar [26, 29].

2.5.2. Peptid hidrolizi

Proteazların katalitik özellikleri, gıda, kimya, ilaç vb. endüstri kollarında çeşitli işlemlerde kullanımlarına olanak sağlamaktadır [29]. Sentetik substratlar üzerinde hidrolitik aktivitenin ölçülmesi, bu enzimlerin proteinleri parçalama spesifikliğini

öğrenmek için basit bir yoldur. Bu spesifiklik özellikleri biyoteknolojik uygulamalar için gıda proteinlerinden biyoaktif peptidlerin üretilmesiyle ilgili önemli bilgiler sağlamaktadır [6]. Enzimatik hidroliz, hidrolizden sonra biyoaktif peptid kaynağı olarak da kullanılabilen farklı gıda protein kaynaklarının kullanılmasına izin vermektedir. Protein ve peptidlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen proteazlar, en önemli ticari ve endüstriyel enzim gruplarından birini temsil etmektedirler. Peptid bağlarının parçalanması enzimatik veya kimyasal olarak gerçekleştirilebilir. Kimyasal, alkali veya asidik bir işlem kullanılarak gerçekleşen hidrolizin kontrol edilmesi zordur ve modifiye amino asitleri içeren hidrolizatların meydana gelmesine neden olur. Proteazlar, oldukça spesifik ve seçici protein modifikasyonlarını destekleyebilirler. Proteinlerin sınırlı proteolizi oluşacak peptidlerin kullanım sahasını arttırabilir. Örneğin, farklı fonksiyonel özelliklere sahip hidrolizlenmiş ürünler spesifik hidrolitik koşulların uygulanmasıyla üretilabilir ve çeşitli endüstrilerde kullanılabilir [29]; antihipertansif veya antioksidan ajanlar olarak çeşitli biyomedikal uygulamalara sahip olabilir [6]. Bu fonksiyonel özellikler nihai ürünün temel özelliklerini belirleyeceğinden, kullanım alanının belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır [29].

2.5.3. Gıda endüstrisi

Gıda endüstrisinde proteazların kullanımı halihazırda iyi bilinmektedir. Gıda proteinlerinin hidrolizi; beslenme özelliklerinin iyileştirilmesi, bozulmanın geciktirilmesi, farklı fonksiyonel özelliklerin (çözünürlük, köpüklenme, koagülasyon ve emülsifiye etme kapasitesi) modifikasyonu, istenmeyen etkileşimlerin önlenmesi, tatların ve kokuların değiştirilmesi ve toksik veya inhibe edici faktörlerin uzaklaştırılması gibi çeşitli nedenlerle gerçekleştirilmektedir. Bu enzimler; süt ürünleri üretimi, fırıncılık ve ksantan sakızının arıtılması gibi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadırlar [6, 29].

2.5.3.1. Peynir yapma

Proteoliz, peynir yapımındaki ana biyokimyasal modifikasyonlardan sorumlu olaylardan biridir ve dolayısıyla gıda sanayinde proteazların en önemli uygulamalarından biri peynir üretimidir. Süt çöktürücü enzimler; hayvan rennetleri, mikrobiyal süt çöktürücü enzimler ve genetiği değiştirilmiş kimozen olarak ayrılabilirler. Kimozen kazein için yüksek spesifikliğe sahiptir, bu nedenle peynir yapımında en çok kullanılan enzimdir. *Mucor michei*, *Bacillus subtilis* ve *Endothia parasitica* gibi GRAS (Genelde güvenli, Generally Recognized as Safe) mikroorganizmaları tarafından üretilen bazı mikrobiyal proteazlar yavaş yavaş kimozenin yerini almaktadırlar. Hemen hemen her çeşit bitki dokusunda süt çöktürme enzimleri bulunmuştur ve tüm proteolitik enzimlerin uygun şartlarda süt çöktürme kabiliyetine sahip olduğu genel bir kural gibi görünmektedir [6, 29, 45].

2.5.3.2. Fırında pişirme

Proteazlar, pişirme işlemi sırasında viskoelastik özellikleri ve kütle genişleme kapasitesini belirleyen çözünmeyen bir protein olan gluteni modifiye etmek için kullanılırlar. Undaki gluten yapısının yumuşatılması proteazlar kullanılarak gerçekleştirilebilir ve bu ayarlama proteazlarla unun muamelesinden sonra elde edilebilen farklı özelliklere sahip ürünlerin miktarını arttırmaktadır. Tat ve lezzet gelişimi de proteazların kullanımı ile elde edilir. Bu amaç için nötral proteazlar kullanılmaktadır. Örneğin nötraz enzimi bisküvi, kraker ve kurabiyelerin pişirilmesinde undaki proteinleri parçalamak için kullanılmaktadır. *Aspergillus oryzae*'den elde edilen proteazlar, çeşitli unlu mamullerin üretimi sırasında işleme ve ambalajlamayı kolaylaştırmak, karıştırma süresini azaltmak ve somun miktarını arttırmak için kullanılmaktadırlar [29, 46].

2.5.4. Ksantan zampkının temizlenmesi

Xanthomonas campestris tarafından üretilen ksantan zampkı gıda, ilaç, tarım gibi çeşitli endüstrilerde bir viskozite kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır.

Mikroorganizmanın ksantan zımkı üretmek üzere fermentasyonu, biyokütlenin ürününden ayrılmasını zorlaştıran yüksek oranda viskoz bir sıvı ortam yaratmaktadır. Fermentasyon ortamının yüksek viskozitesinden dolayı santrifüj işlemi ayırma için yeterli değildir ve bu amaçla kullanılan ısıl işlem zımkın termal bozunmasına neden olabilmektedir. Bu yüzden hücre kütlelerinin ayrılması genellikle proteazlar kullanılarak enzimatik yolla yapılmaktadır [29].

2.5.5. Deri endüstrisi

Proteazlar, hayvan derilerinin işlenmesinde zehirli ve tehlikeli kimyasal ürünler içeren geleneksel kimyasal işlemlerin yerine kullanılmaktadırlar. Derinin temel proteini kolajen'dir. Deri ile ilgili bazı işlemler, kısmen veya tamamen kolajen harici bileşenlerin giderilmesini gerektirir. Bu değişikliklerin derecesi, derinin fiziksel özelliklerinin kontrolünü sağlar. Proteazlar, kıl giderimini desteklemek, cildin kolajen harici bileşenlerini parçalamak ve fibriler yapıda olmayan proteinleri yok etmek için kullanılırlar. Bu enzimlerin kullanımı, deri kalitesinin iyileştirilmesi ve çevre kirliliğinin azaltılması için iyi bir alternatiftir. Alkali proteazlar kıl giderimi için gereken koşullar altında daha kararlı ve aktif olmalarından dolayı bu işlemde en çok kullanılan enzimlerdir. Ayrıca bu enzimler, suyun daha hızlı emilmesini sağlayarak daldırma süresini azaltırlar [29, 47].

2.5.6. İlaç endüstrisi

Proteazlar ayrıca ilaç endüstrisinde de önemli bir uygulamaya sahiptirler. Geleneksel tıpta uzun bir süredir yüksek oranda proteolitik enzim içeren bitki özütleri kullanılmaktadır. Bu özütler antitümoral olarak, sindirim bozuklukları, kanser, şişme ve immün modülasyon problemlerinin tedavisinde kullanılmıştır. İyi bir örnek ananastan elde edilen bromelin'dir. Bromelin'in hücre yüzey yapılarını peptid parçalanması ile modifiye etme kapasitesine bağlı olarak ödem, platelet agregasyonu ve metastazı önleyebildiği gösterilmiştir. Salas ve ark., bitki sistein proteazlarının farmakolojik aktivitelerini memelilerde yara iyileşmesi, immünomodülasyon,

sindirim koşulları ve neoplastik değişikliklerdeki rollerini vurgulayarak incelemişlerdir [6, 48].

2.6. Proteazların İmmobilizasyonu

Enzimler, birçok kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonu katalizleyen biyokatalizörlerdir. Bu biyokatalizörler, bitkiler, hayvanlar ve mikrobiyal hücrelerde evrensel olarak bulunurlar. Enzimler, fırıncılık, süt ürünleri, nişasta dönüşümü ve meşrubat işleme gibi gıda sanayilerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Enzimler aynı zamanda son ürüne istenen dokuyu vermek amacıyla tekstil endüstrisinde de yaygın olarak kullanılırlar. Enzimlerin kullanımı aynı zamanda deterjan endüstrisinin, kağıt ve kağıt hamuru yapımının çok önemli bir parçasıdır. Sağlık ve ilaç endüstrisi ve kimyasal üretim gibi birçok endüstri, üretimini arttırmak için enzimlerin katalitik özelliklerinden faydalanmaktadır. Ayrıca atık yönetimi sektöründe, kirli suyun arıtılması ve katı çöplerin arıtılması için de enzimler kullanılmaktadır. Geçtiğimiz yıllarda canlı/organik maddelerden biyo-yakıtların üretiminde kullanılan enzimlerin değeri muazzam bir şekilde artmıştır. Biyokatalizatörler, kolayca üretilibilmeleri, aktivitelerindeki yüksek spesifiklik ve çevre dostu olmaları nedeniyle endüstriyel sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bazen enzimlerin endüstrideki uygulamaları, raf ömrü, geri kazanım ve yeniden kullanılabilirlik gibi özellikleri nedeniyle sınırlı kalmaktadır. Bu problemlerin üstesinden gelmek için enzimler çoğunlukla immobilize edilerek kullanılmaktadırlar. Ticari ölçekte kullanımda, bu biyokatalizörlerin yeniden kullanılabilirlik faktörü çok önemli hale gelir ve yeniden kullanılamayan enzimler ekonomik olamazlar. Biyokimyasal reaksiyon sırasında bu biyokatalizörlerin kararlılığını korumak zor bir görevdir. Bu nedenle, bu zorlukla başa çıkabilmek için, enzimler maliyetli bir yöntem olduğu gerçeğine rağmen immobilizasyon işlemi ile tekrar tekrar kullanılarak verimli bir hale getirilirler. Immobilize edilebilmeleri amacıyla enzimler substrat veya ürün dışındaki özel bir destek malzemesine bağlanırlar. Enzimlerin immobilizasyonu için destek malzemesi olarak kullanılan malzemeler çoğunlukla inert polimerler veya inorganik bileşiklerdir. İdeal bir destek

malzemesi uygun maliyetli, inert, fiziksel olarak güçlü ve yenilenebilir olmalıdır. Enzimler birçok farklı metodla immobilize edilebilirler [49].

Proteazlar muazzam çeşitlilikte ve farklı spesifiklik özelliklerine sahip enzimlerdir. Proteazların uygulama alanlarının genişlemesi, sürekli inovasyon çalışmalarına, yeni enzimlerin araştırılmasına ya da daha önceden bilinen enzim performanslarının geliştirilmesine bağlıdır. Proteazlar arasındaki spesifiklik farklılıklarının bilgisi, gerçekleştirilecek işleme göre proteazın seçimi için bir kılavuz olarak çok önemlidir. Endüstriyel işlemler çoğu zaman, proteazların getireceği faydaları ciddi ölçüde zarara uğratabilecek kompleks ve değişken bir çevresel bileşim (metallerin, asitlerin, inhibitörlerin varlığı/yokluğu) sunmaktadır. Bu nedenle, proteaz stabilitesinin iyileştirilmesi, bir dizi avantaj sağlayacaktır. Bu gibi sebeplerle enzim stabilizasyonunun iyileştirilmesi geniş bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir. Enzim stabilizasyonunun iyileştirilmesinde immobilizasyon sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Enzim immobilizasyonu, alt birimlerin ayrışmasının önlenmesiyle enzimlerin stabilitesini artırabilir ve ayrıca üç boyutlu enzim yapılarının rijitleşmesini teşvik ederek ısı veya pH değişimlerinin neden olduğu konformasyonel değişikliklere enzimlerin daha yüksek bir direnç göstermesini sağlayabilir. Stabilizasyona ek olarak, immobilize enzimlerin kullanımı, işlem sonunda enzimin inaktivasyonunun gerekli olmadığı proseslerde katalizörün reaksiyon ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi gibi büyük bir avantaj sunar [50].

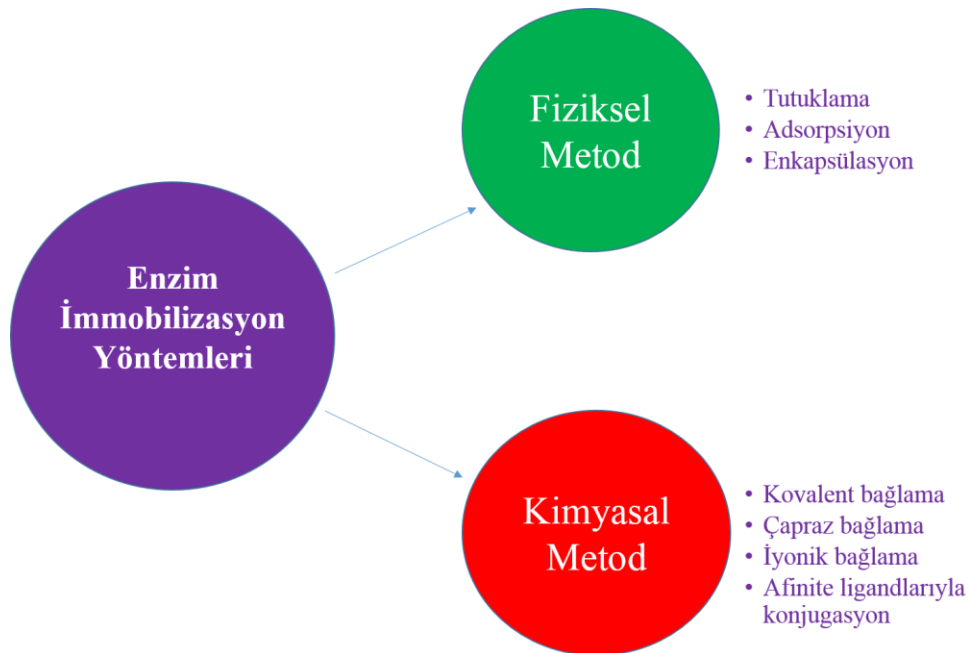
Özellikle tripsin ve onu takiben kimotripsin, karboksipeptidaz ve alkalaz gibi proteazların immobilizasyon çalışmaları, bu enzimlerin geniş uygulama alanları nedeniyle en çok alıntı yapılan çalışmalar arasındadır. Poli (vinil amin) ile işlevselleştirilmiş silika mikropartikülleri, selülozik ekzopolisakkarit zarı ve hatta modifiye edilmiş tahıl küspeleri gibi farklı destekler proteazların immobilizasyonu ve stabilizasyonu amacıyla kullanılmış ve başarıyla uygulanmıştır. Diğer birçok çalışma, immobilize proteazların stabilitelerini farklı çevre koşullarına göre geliştirdiğini göstermiştir. Ju ve ark., gerçekleştirdikleri çalışmada Fe_3O_4 -CS nanopartikülleri üzerine kovalent bağlanma yoluyla immobilize edilen kimotripsinin farklı asidik pH'larda yüksek stabilite sergilediğini göstermiştir. Bir başka çalışmada

çitosan üzerinde immobilize edilen pepsin ezimi, termal denatürasyona karşı gelişmiş bir kararlılık sergilemiştir. Ek olarak, Bacheva ve ark., 5–8 M üre içeren bir tampon içerisinde ve asetonitril/% 60-90 DMSO (dimetilsülfoksit) karışımlarında immobilize edilmiş subtilisin stabilitesinin, serbest enziminkinden önemli ölçüde daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Görüldüğü gibi birçok farklı immobilizasyon yöntemi ve bu yöntemlere uygun çeşitli taşıyıcılar proteazların immobilizasyonunda kullanılmaktadır [50].

2.6.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri

2.6.1.1. Fiziksel yöntem

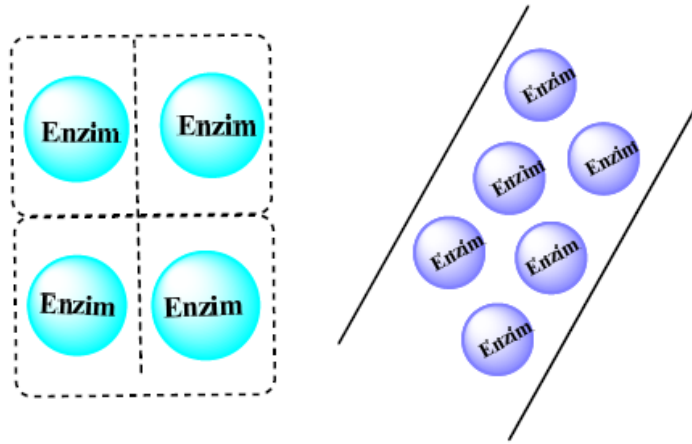
Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması Şekil 2.9.'da şematize edilmiştir. Burada belirtilen fiziksel yöntemlerle enzimlerin immobilizasyonu, van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağlarını içeren fiziksel kuvvetler aracılığıyla farklı taşıyıcılara enzimlerin bağlanmasını (tutturulmasını) kapsayan süreçlerdir. İşlem, fizikokimyasal parametrelerin kontrol edilmesiyle geri dönüşümlüdür [51].



Şekil 2.9. Enzim immobilizasyonunda kullanılan tekniklerin sınıflandırılması [51]

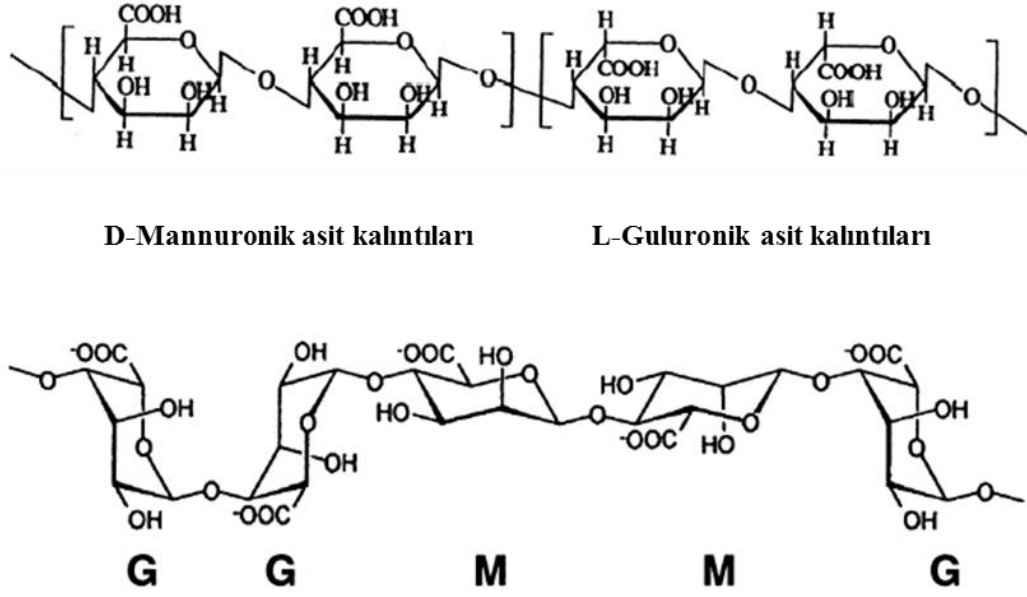
2.6.1.1.1. Tutuklama

Bu yöntem, enzimin bir polimere (poliakrilamid, aljinat vb.) her yönden çapraz bağlanmasını ve enzimin yüzeyinde bulunan hemen hemen her yan zincirin, polimer kafes içindeki fiziksel çevrenmeyle hapsedilmesini içerir [51]. Şekil 2.10.'da polimer matrikste enzimlerin tutklanması gösterilmiştir [52]. Kullanılan taşıyıcı, uygun büyüklükteki substratın kafes içerisine geçişini ve substratın sürekli dönüşümü ile üretilen ürün moleküllerinin serbest kalmasını sağlar. Bununla birlikte, bu yöntem sadece sınırlı sayıda enzimde kullanılabilir. Bu yöntemin, basitlik, enzimin içsel özelliklerinde hiçbir değişiklik olmaması, kimyasal modifikasyon içermemesi, minimal enzim gereksinimi ve çeşitli şekillerdeki taşıyıcıların mevcut olması gibi birkaç avantajı vardır. Bunun yanında, enzim kaçağı, sadece küçük boyutlu substrat/ürünlerin kullanılabilmesi, taşıyıcının mekanik özellikleri ile enzim aktivitesi üzerindeki etkisi arasında hassas bir denge gerektirmesi ve difüzyonel kısıtların varlığı gibi çeşitli dezavantajları da mevcuttur [51, 53].



Şekil 2.10. Polimer matrikste tutuklama [52]

Bu tez çalışmasında tutuklama yöntemlerinden biri olan “aljinat jelde tutuklama” yöntemi kullanılmıştır. Aljinat doğal olarak oluşan ve doğada oldukça bol bulunan bir biyopolimerdir. Aljinatlar, (1-4) bağlı β -D-mannuronik asit (M) ve α -L-guluronik asit (G) kalıntılarından çok çeşitli bileşim ve dizilerinden oluşur. Bu yapılar Şekil 2.11.'de gösterilmiştir [54, 55].



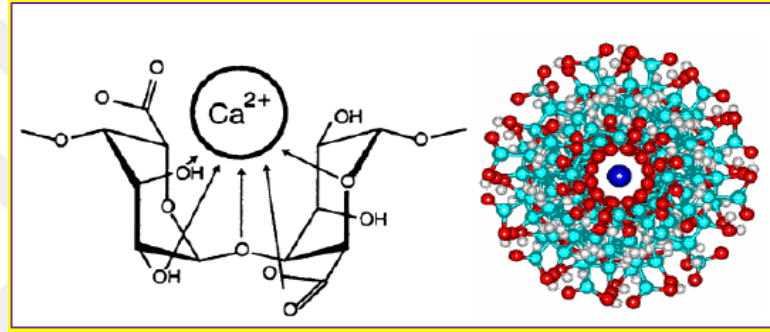
Şekil 2.11. Mannuronik (M) ve guluronik (G) asit monomerlerinin kimyasal yapıları ve aljinat zincir konformasyonu [54]

Genel olarak, eğer yapı içerisinde G blok oranı yüksekse, aljinatlar basınca karşı daha dirençli jeller oluştururlar, fakat bu jeller kırılgandır. G blok oranı düşükse, aljinatlar basınca karşı daha az dirençli jeller oluşturur, ancak bu jeller esnektir. Piyasada bulunan tüm aljinatlar kahverengi *Algae Laminaria*, *Macrocystis* ve *Ascophyllum*'dan ekstrakte edilir. Bakteriyel aljinatlar ayrıca *Azotobacter vinelandii* ve birkaç *Pseudomonas* türünden izole edilmiştir. Bir aljinatın yapısı ve molekül ağırlığı, alg tipine, alg yaşına, yetiştiği bölgeye ve ekstraksiyon işlemlerine bağlıdır [54].

Aljinat, alglerde kalsiyum tuzu olarak bulunur. Piyasaya genellikle sodyum aljinat şeklinde sunulur. Sodyum aljinat gıda sektöründe jelleştirici, stabilizatör ve kıvam artırıcı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Aljinat jeller ayrıca, proteinler, ilaçlar ve hücreler için matriks olarak kullanılırlar [54].

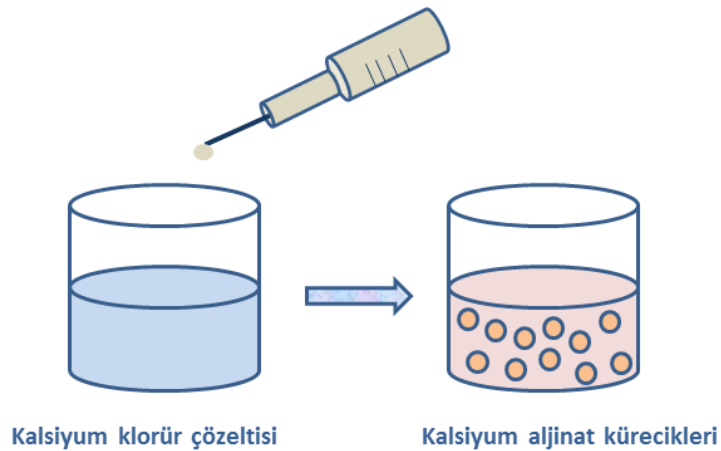
Aljinik asit ve aljinik asidin sodyum, potasyum ve amonyum tuzları suda kolaylıkla çözünmesine rağmen, aljinik asidin kalsiyum tuzunun sudaki çözünürlüğü son derece sınırlıdır. Sodyum aljinat kokusuz, tatsız bir tozdur ve suda çözündüğünde viskoz bir kolloidal çözelti oluşturur [54].

Bir matriks olarak aljinat, biyo-uyumluluk, düşük toksisite ve iyonotropik jelleşme yoluyla kolay boncuk oluşumu gibi özelliklerinden ötürü yoğun ilgi görmektedir. Ek olarak, normal fizyolojik koşullar altında çözünür ve parçalanabilir özellikte olması gibi avantajlara sahiptir. Aljinatın önemli bir özelliği iyonotropik jelleşmedir, aljinat negatif yüklü bir polimerdir ve iki değerlikli katyonlarla reaksiyon vererek jel oluşturur (örneğin Ca^{2+}). Aljinat çözeltisinin ve CaCl_2 'ün konsantrasyonlarının artırılması, daha sıkı çapraz bağlı jellerin oluşmasına neden olur. "G" kalıntıları bakımından zengin aljinat polimer bölgeleri, mannuronik açıdan zengin bölgelere göre iki değerlikli iyonlar için daha yüksek seçicilik sergiler (Şekil 2.12.) [54, 56].



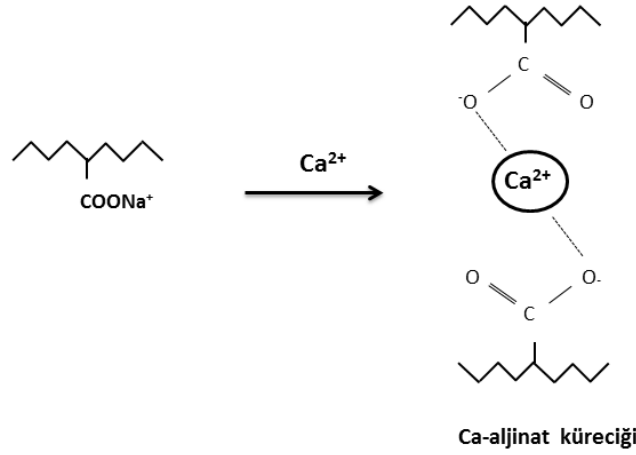
Şekil 2.12. İki değerlikli katyonların α -L-guluronat kalıntılarının homopolimerik bloklarına bağlandığı "yumurta kutusu" modeli [54]

Sodyum aljinat çözeltisi, iki değerlikli katyon çözeltisine damlacıklar halinde bırakıldığında polimerler arasında çapraz bağlar oluşarak Şekil 2.13.'de gösterildiği gibi aljinat boncukları meydana getiriler [54].



Şekil 2.13. Ca-aljinat kürecikleri ile enzim immobilizasyonu [54]

Yapıda bulunan Na^+ iyonlarının iki değerlikli katyonlarla yer değiştirmesi sonucu birbirine sıkıca tutunan zincirler sayesinde bu jel yapısı oluşur (Şekil 2.14.) [54].



Şekil 2.14. Ca-aljinat boncuklarının oluşumu için temel mekanizma [54]

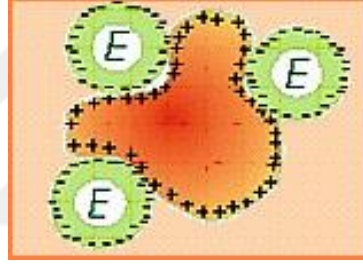
Bu tür çapraz bağlama çözeltileri Ca^{2+} , Sr^{2+} veya Ba^{2+} gibi katyonları içerebilirken, monovalent katyonlar ve Mg^{2+} jelleşmeye neden olmaz ve Ba^{2+} ve Sr^{2+} iyonları çok güçlü aljinat jelleri üretir. Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} ve Mn^{2+} dahil olmak üzere birçok başka katyonlar jelleşmeye neden olurlar, ancak toksisiteleri nedeniyle nadiren kullanılırlar [54].

Aljinat boncuklarının yüksek su muhtevası nedeniyle, mikro-ortam genellikle protein ilaçlarına ve hücrelere karşı inerttir. Ayrıca, aljinat matriksler biyolojik olarak parçalanabilir özelliktedirler ve normal fizyolojik koşullar altında parçalanabilirler. Bütün bu avantajlar, özellikle kontrollü ilaç ve diğer biyolojik olarak aktif bileşiklerin salınımı gibi biyomedikal uygulamalar ve ayrıca hücrelerin enkapsülasyonu için aljinatları çok yararlı materyaller haline getirir [54, 57].

2.6.1.1.2. Adsorpsiyon

Bu yöntemde enzim destek malzemesine iyonik veya hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri dahil olmak üzere kovalent olmayan bağlar ile, destek maddesinin herhangi bir ön aktivasyonu olmaksızın bağlanır. Kullanılan taşıyıcılar ya organik ya da inorganik niteliktedir. Seramik, alümin, aktif

karbon, kaolinit, bentonit, gözenekli cam, çitosan, dekstran, jelatin, selüloz ve nişasta bu taşıyıcılara örnek verilebilir. İmmobilizasyon yöntemi, pH, sıcaklık, çözücünün yapısı, iyonik şiddet, enzim konsantrasyonu ve adsorban gibi değişkenlerin optimizasyonunu içerir. Burada enzim, yıkama esnasında adsorbe edilmemiş herhangi bir enzim uzaklaştırılmadan, doğrudan yüzeye (aktif adsorban) ilave edilir. Yöntem, herhangi bir konformasyon değişikliğine neden olmadan, enzim immobilizasyonunda olduğu kadar eşzamanlı saflaştırma amacıyla da yardımcı olan çok çeşitli taşıyıcılar ile basit ve yumuşaktır. Bununla birlikte, mikro ortamındaki küçük değişiklikleri (örneğin pH, sıcaklık, çözücü, iyonik şiddet ve yüksek substrat konsantrasyonu) izleyen enzim desorpsiyonunda rol oynayan bir dizi faktörün rolüne bağlı olarak yoğun optimizasyon gerektirir [51, 58]. Şekil 2.15.'de enzim moleküllerinin taşıyıcı üzerinde fiziksel adsorpsiyonu gösterilmektedir [59].

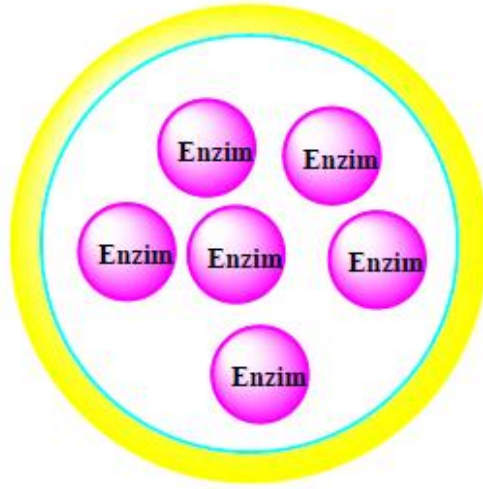


Şekil 2.15. Fiziksel adsorpsiyon [59]

2.6.1.1.3. Mikrokapsülleme

Mikrokapsülleme yönteminde enzimler, belirli gözenek boyutuna sahip (1-100 μm) küresel yarı geçirgen polimer membranlar içine alınarak immobilize edilirler. Yarı geçirgen membranlar, bileşenlere dayalı kalıcı veya kalıcı olmayan membranlar olabilir. Kalıcı membranlar, selüloz nitrat ve polistirenden yapılırken, kalıcı olmayan membranlar sıvı yüzey aktif maddeden yapılır. Bu membranlar ayrıca boyaların, ilaçların ve diğer kimyasalların mikrokapsüllenmesinde de kullanılır. Mikrokapsülleme ile immobilize edilen enzimler, daha yüksek katalitik verime sahip oldukları için çok büyük yüzey alanlarına sahiptirler. Bununla birlikte, yüksek enzim konsantrasyonuna rağmen enzimin az rastlanan inaktivasyonunu bildiren birkaç

Çalışma mevcuttur [51]. Enzim moleküllerinin küresel yarı geçirgen polimer membranlar içine alınarak immobilizasyonu Şekil 2.16.'da gösterilmiştir [52].



Şekil 2.16. Mikrokapsülleme [52]

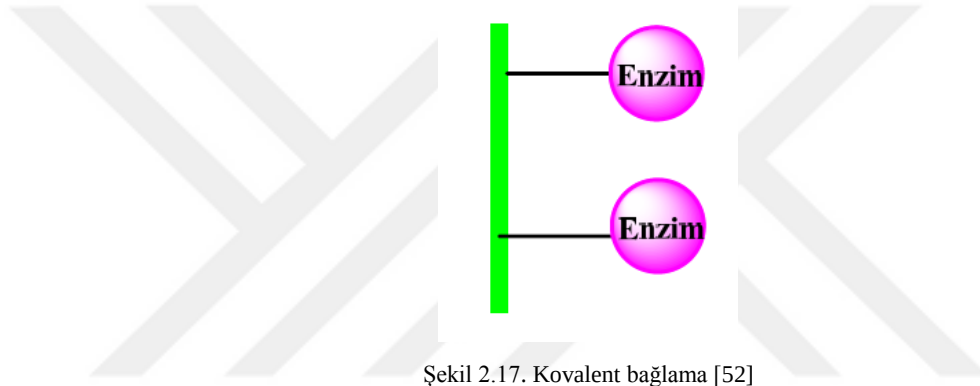
2.6.1.2. Kimyasal yöntem

Kimyasal yöntemlerle enzim immobilizasyonu, enzimlerin kovalent veya iyonik bağlar kullanarak farklı taşıyıcılara bağlanmasını içerir ve işlem geri dönüşümsüzdür (Şekil 2.9.) [51].

2.6.1.2.1. Kovalent bağlanma

Enzim, kovalent bağlar (diazolama, amino bağı, Schiff bazı oluşumu, amidasyon reaksiyonları, tiyol-disülfid, peptid bağı ve alkilleme reaksiyonları) vasıtasıyla taşıyıcıya bağlanır. Enzim molekülleri, ya doğrudan taşıyıcı üzerinde bulunan reaktif gruplara (örneğin hidroksil, amid, amino, karboksil grupları) ya da çeşitli kimyasal reaksiyonlar yoluyla (örneğin diazolama, schiff bazı, imin bağ oluşumu gibi) yapay olarak taşıyıcıya bağlanmış bir uzatma kolu ile taşıyıcıya bağlanır. Yaygın olarak kullanılan taşıyıcılar doğal (örneğin cam, Sefadeks, Agaroz, Sefaroz) olabildiği gibi sentetik (örneğin Akrilamid, metakrilik asit, stiren) olanlar da mevcuttur. Belirli bir taşıyıcının seçilmesi, çeşitli uygulamalar sırasındaki maliyeti, kullanılabilirliği, bağlama kapasitesi, hidrofiliklik, yapısal sertlik ve dayanıklılığa bağlıdır. Bu

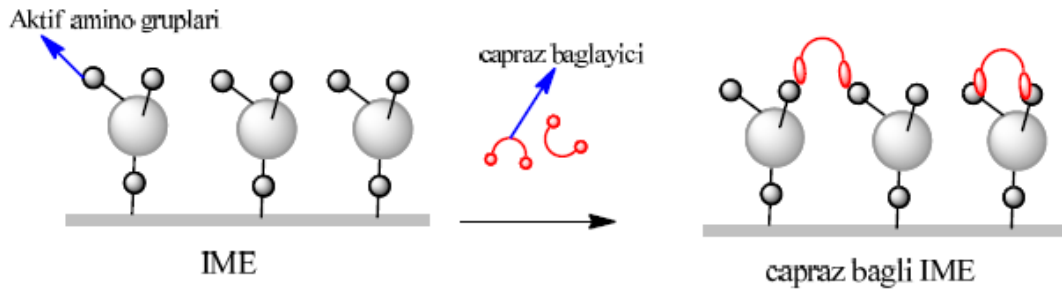
immobilizasyon yöntemi, asgari konformasyonel değişikliklere yol açan, esansiyel olmayan amino asitleri (aktif bölge grupları dışında) içerir. Ekstrem fiziksel ve kimyasal koşullara (örneğin sıcaklık, denatüre edici maddeler, organik çözücüler) karşı immobilize enzimin direncini arttırmaya yardımcı olur. Bununla birlikte, bu immobilizasyon yöntemi enzim esnekliğini azaltarak enzim üzerinde daha büyük bir baskıya yol açar. Ayrıca sert immobilizasyon koşullarından ve bazen enzimin taşıyıcı ile etkileşimi sırasında meydana gelen aktif bölgedeki benzer amino asit yan zincir gruplarının rekabetinden kaynaklı olarak enzimin konformasyonel ve katalitik özelliklerinde büyük değişikliklere yol açar. Şekil 2.17., taşıyıcı yüzeyi ve enzim molekülleri arasındaki kovalent bağlanmayı göstermektedir [51, 52, 60].



Şekil 2.17. Kovalent bağlama [52]

2.6.1.2.2. Çapraz bağlama

Bu yöntem, iki veya çok fonksiyonlu reaktifler (örneğin glutardialdehid, glutaraldehid, glioksal, diizosiyanatlar, heksametilen diizosiyanat, toluen diizosiyanat) kullanılarak enzim ve taşıyıcı arasında bir dizi kovalent bağın oluşturulmasını içerir. Genel olarak, ılımlı koşullar altında enzim bağlanması için lizin amino grubu, sistein sülfhidril grupları, tirozin fenolik OH grupları veya histidin imidazol grubu kullanılır. Bu yöntemin esas avantajı basitliğidir. Bununla birlikte, reaksiyonun düzenlenmemişliği nedeniyle büyük miktarda enzim kaybına yol açar. Dahası, bu enzim immobilizasyon yöntemi difüzyonun neden olduğu sınırlamalardan muzdariptir [51, 61]. Şekil 2.18.'de taşıyıcı üzerinde immobilize edilmiş enzim moleküllerinin çapraz bağlayıcı reaktif kullanılarak çapraz bağlanması gösterilmiştir [52].



Şekil 2.18. Çapraz bağlama (IME: İmmobilize enzim) [52]

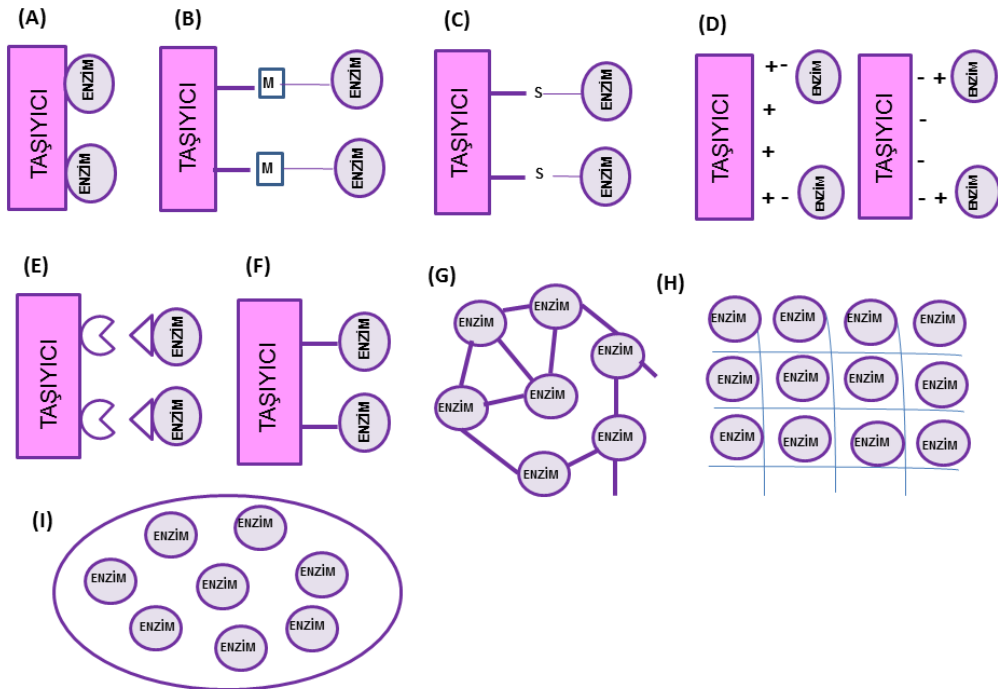
2.6.1.2.3. İyonik bağlanma

İyonik bağlama yöntemi, yüklü bir taşıyıcı ile enzim molekülleri arasındaki iyonik etkileşimlere dayanır (Şekil 2.19.). Burada, taşıyıcı üzerindeki yüzey yük yoğunluğu ne kadar yüksek olursa, taşıyıcının bağlı olduğu enzim miktarı o kadar fazla olacaktır. Bazen iyonik etkileşimlere ek olarak, enzim molekülleri ayrıca taşıyıcı yüzeyinde fiziksel olarak adsorbe edilir. Bu immobilizasyon yöntemi fiziksel adsorpsiyon yöntemine benzerlik göstermektedir. İmmobilizasyon sırasında iyonik etkileşimler yoluyla enzim bağlanması çözeltinin pH'ına, enzim konsantrasyonuna ve sıcaklığa bağlıdır. Yaygın olarak kullanılan taşıyıcılar şunlardır: polisakkarit türevleri (örneğin dietilaminoetilselüloz, dekstran, karboksimetilselüloz, çitosan), sentetik polimerler (örneğin polistiren türevleri, polietilen vinilalkol) ve inorganik malzemeler (örneğin amberlit, alümin, silikatlar, bentonit, sepiolit, silika jel). Bu immobilizasyon yöntemi, enzim konformasyonunda minimal değişikliklere yol açar. Bununla birlikte, doğru iyonik şiddetin sürdürülmesine ve immobilize enzimin aktivite gösterdiği çözeltinin pH'ına özellikle dikkat edilmektedir, çünkü uygun olmayan koşullar altında taşıyıcıdan enzimin ayrılma olasılığı artmaktadır [51, 62, 63].

2.6.1.2.4. Afinite ligandları ile konjugasyon

Özel ligandlar kullanılarak enzimin taşıyıcıya bağlanmasıdır (Şekil 2.19.). Enzim üzerindeki histidin-işaretli kısımların bir metal içeren taşıyıcıya bağlanması veya lektin içeren bölgelerin taşıyıcı üzerinde bulunan karbohidrat parçalarına bağlanması

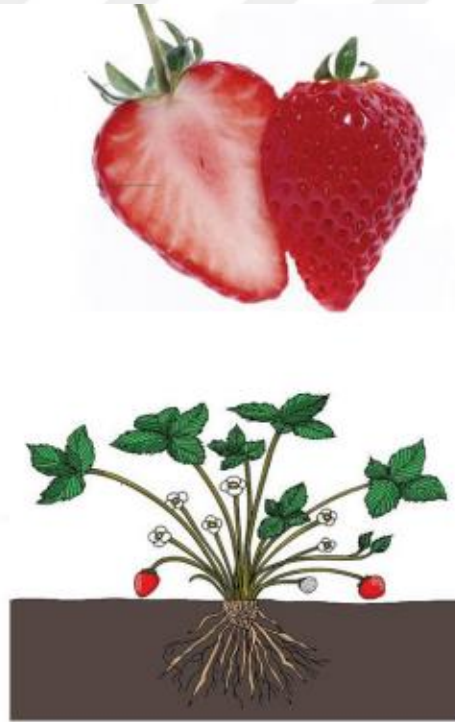
örnek olarak verilebilir. Bu yöntemde bazen kimyasal bileşikler taklit eden substratlar da ligandlar olarak kullanılabilirler. Bazı durumlarda, ligandlar enzim üzerinde doğal olarak bulunurken, diğer durumlarda, verilen enzimin bir polipeptidini kodlayan DNA işaretlemesine karşılık gelen bir nükleotid dizisini kaynaştırmak suretiyle yapay olarak bağlanırlar. Bu immobilizasyon yöntemi, enzim konformasyonunda minimum etkilere yol açmakta ve ayrıca aktif bölge kalıntılarının taşıyıcıya bağlanmaya dahil olmamasına bağlı olarak immobilize enzimin yüksek kararlılığı, katalitik etkinliği ve taşıyıcı üzerindeki yüksek yoğunluklu ligandların varlığına bağlı olarak daha yüksek immobilizasyon verimine yol açmaktadır. Bu yöntem sadece enzim immobilizasyonu için değil aynı zamanda antikorlar, sitokinler, streptavidin gibi birçok protein için de yararlıdır. Bu yöntemle immobilize edilen enzimler biyoteknolojide, teşhis ve ilaç sanayiinde çeşitli uygulamalar bulmuştur. Bu yöntem, farklı tipteki memeli hücrelerinin yüzeylerinde var olan spesifik bağlanma bölgesi üzerinden, çeşitli peptidleri, büyüme faktörlerini ve sitokinleri içeren farklı taşıyıcılara bağlanması yoluyla hayvan hücre kültüründe de kullanılmıştır [51, 63, 64].



Şekil 2.19. Enzim immobilizasyon teknikleri (A: adsorpsiyon, B: şelatlama, C: disülfid bağı, D: iyonik bağlanma, E: afinite bağlanması, F: kovalent bağlanma, G: çapraz bağlanma, H: tutuklama, I: enkapsülasyon) [63]

2.7. Çilek (*Fragaria ananassa* L.)

Fragaria ananassa L. (Şekil 2.20.) [66], *Rosaceae* ailesinin bir üyesidir. Her yıl filizlenen çok yıllık bir bitkidir. Neredeyse aynı uzunlukta olan yaprakları ve çiçekleri toprak yüzeyinden toplanır. Çilek meyvesinin ve yapraklarının hafif damar büzücü, diüretik, laksatif ve uyarıcı etkileri bulunmaktadır. Hem meyvenin kendisi hem de yaprakları eski ilaç kılavuzlarında yer almaktadır. Çilek meyvesinin aynı zamanda diş temizleyici özelliği de bulunmaktadır. Taze çilek dişlerde yaklaşık beş dakika kaldığında diş lekelerini çıkarmaktadır [66]. Çilek, tam boy ve olgunluğa gelmesi genellikle ~30 gün süren, olgunlaşmaya devam etmeyen (klimakterik olmayan) bir meyvedir. Bu süre büyük ölçüde; ışığa, sıcaklığa, toprak kompozisyonuna ve diğer ekim koşullarına bağlıdır.



Şekil 2.20. Çilek (*Fragaria ananassa* L.) [66]

Çilek, çekici rengi ve tadının yanı sıra, karbohidratlar, C vitamini, fenolik maddeler ve flavonoidler gibi antioksidan bileşikler açısından zengin bir kaynaktır [67]. Bu meyvenin kimyasal bileşenleri arasında şekerler ve organik asitler çok önemlidir [68]. Şekerler, çilek meyvesinin başlıca çözünür bileşenlerinden birini oluşturur [65],

meyve aromasının oluşumuna katılırlar ve meyvenin kalori değerini belirlerler. Şekerler gibi organik asitler de lezzet açısından önemlidirler. Çilek hasadı için en uygun zamanı belirlemek amacıyla şeker/asit oranı hesaplanmaktadır; bu oran kalite endeksi olarak kabul edilmektedir [67]. Organik asitler, bu meyvenin duysal kalitesini değiştirerek, lezzet, doku, pH ve çilek renginin oluşumuna katkıda bulunurlar [68]. Sitrik asit, çilekte en bol bulunan organik asittir. Çilek ayrıca, malik ve süksinik asitler dahil olmak üzere bir dizi başka asitleri düşük konsantrasyonlarda içermektedir [65]. Çilekteki en önemli vitamin, C vitaminidir. Bu vitamin, insan sağlığı ve beslenmesi üzerinde birçok koruyucu etki gösterir [68]. Çilek ayrıca iyi bir tiamin, riboflavin ve nikotinik asit kaynağı olarak kabul edilmektedir [65]. Flavonoidler bitkisel besinlerde yaygın olarak bulunan biyoaktif bileşiklerdir ve antosiyaninler, flavonlar, flavanonlar, flavonoller ve tanenler dahil olmak üzere çeşitli yapısal sınıflarda gruplanabilirler. Meyvelerin duysal özellikleri ile yakından ilişkili olmalarının yanı sıra, flavonoidler ve fenolik asitler, insanlarda kalp koruyucu etkiler oluşturabilecek potansiyel antioksidan aktiviteleri nedeniyle artan bir ilgi görmektedirler. Antosiyanin miktarı, çileklerin olgunluk değerlendirmesi için önemlidir. Hasat için kullanılan olgunluk indeksi, meyvenin yarısı veya dörtte üçüne karşılık gelen, antosiyanin sentezinden kaynaklanan kırmızı renktir. Çilekte bulunan ana antosiyaninler, siyanidin 3-glukozit, pelargonidin 3-rutinosid ve pelargonidin 3-glukozittir [67].

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışmasında kullanılan çilek meyvesi Sakarya'nın Hendek ilçesindeki bir yerel pazardan alınmıştır. Çilek, çabuk bozulan bir meyve olduğundan alındıktan hemen sonra derin dondurucuya kaldırılıp çalışma boyunca derin dondurucuda -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Kullanılan Araç-Gereçler

Tez çalışmasında kullanılan başlıca araç-gereçler Tablo 3.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Çilek proteaz enzimi ile gerçekleştirilen deneylerde kullanılan ekipmanlar

Cihaz	Model	Marka
UV-Vis Spektrofotometre	MULTISKAN GO	Thermo SCIENTIFIC
Soğutmalı santrifüj	NF 800 R	Nüve
Santrifüj	NF 200	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	MSH-20D	WiseStir
Soğutucu kabin	Özel yapım	Özel yapım
pH metre	PHS-3BW	BANTE instrument
Protein elektroforezi	Mini-PROTEAN Tetra System	BIO-RAD
Su banyosu	Nb20	Nüve
Hassas terazi	AS 220/C/2	RADWAG
Çalkalamalı inkübatör	ES-20	Grant-bio
Vortex	QL-861	HINOTEK
Blender	wizzard Pro	KENWOOD
Otomatik pipetler	Eppendorf Research plus	Eppendorf
Derin dondurucu	UDD 100BK	Uğur

3.3. Analizler

3.3.1. Çilek proteazının saflaştırılması ve karakterizasyonu

3.3.1.1. Çilek meyvesi ham ekstraktının hazırlanması

Dondurucuda depolanmış 50 g çilek meyvesi ince ince doğranmıştır. 100 mL 0,1 M soğuk fosfat tamponu (pH 7) ile blender kullanılarak 5 dk boyunca parçalanmıştır. Elde edilen homojenat, 4 °C'de 30 dk boyunca manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırıldıktan sonra üç kat tülbent bezinden süzölmüş ve 5000 rpm'de 15 dk süresince santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant, ham enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır.

3.3.1.2. Afinite kromatografisi ile enzimin saflaştırılması

3.3.1.2.1. Sefaroz 4B'nin aktifleştirilmesi

Sefaroz-4B jeli (10 mL), distile su ile iyice yıkanarak dekante edilmiştir. Üzerine eşit hacimde distile su eklenmiştir. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 1,5 g toz haline getirilmiş CNBr'ün hepsi birden katılmıştır. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'ı 1 M NaOH ile hemen 11'e çıkarılıp reaksiyon boyunca bu pH muhafaza edilmiştir. Sıcaklık bir termometre vasıtasıyla kontrol edilmiş ve gerektiğinde buz eklenerek 20 °C'de sabit tutulmuştur. Reaksiyona pH değişmeyene kadar devam edilmiştir (40-45 dk). Çok miktarda buz süspansiyona katılmış ve karışım bir huniye, filtre kağıdı üzerine nakledilip 150 mL soğutulmuş 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH 10) ile yıkanmış ve ardından bir behere alınmıştır [69].

3.3.1.2.2. L-tirozinin bağlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 20 mL'sinde 15 mg L-tirozin içeren 0,1 M NaHCO₃ tamponunun (pH 10) soğuk çözeltisi ilave edilmiştir. Ardından süspansiyon 4 °C'de 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve 16 saat 4 °C'de bekletilmiştir.

Bu sürenin bitiminde bol su ile yıkanmıştır (yıkama suyu 280 nm’de absorbanı vermeyinceye kadar). Böylece reaksiyona girmeyen L-tirozin tamamen uzaklaştırılmıştır. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO_3 tamponu (pH 8,8) ile tekrarlanmıştır. Tirozinle bağlanan sefaroze-4B aynı tamponun 40 mL’si içine alınmıştır [69].

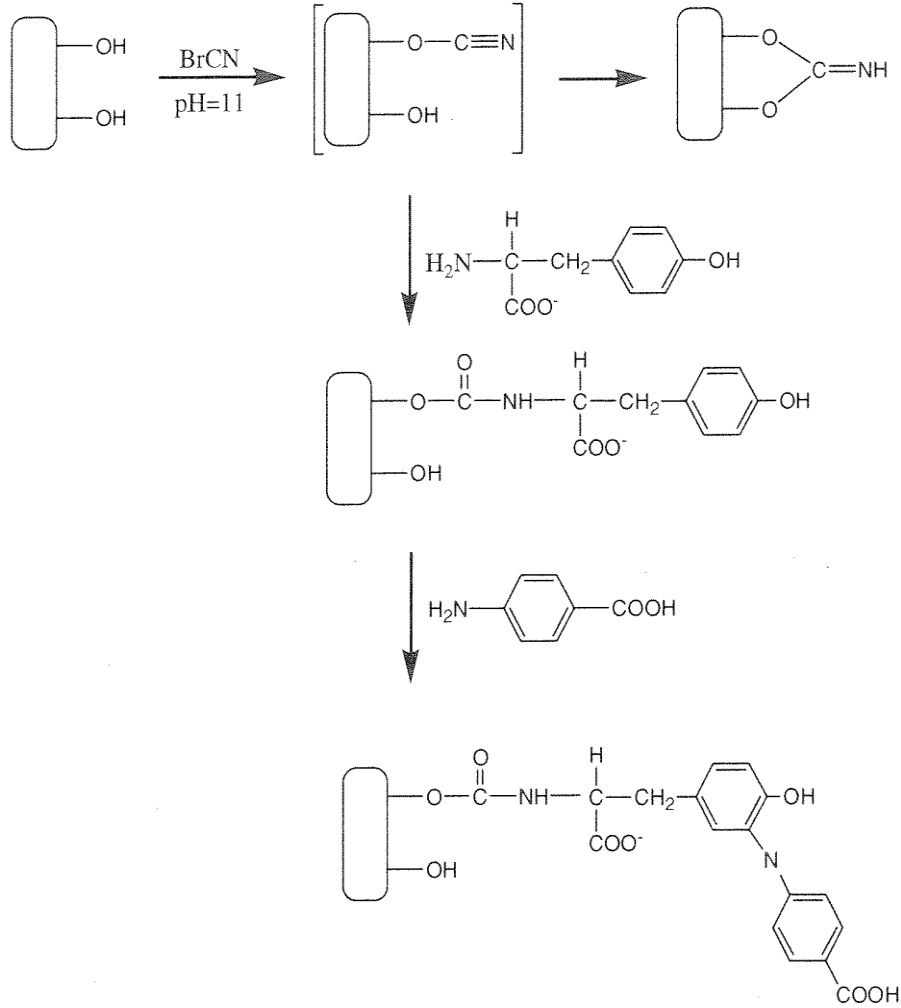
3.3.1.2.3. p-aminobenzoikasıit bileşığının bağlanması

12,5 mg p-aminobenzoikasıit 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözülmüştür. 37,5 mg NaNO_2 ihtiva eden 0 °C’deki sulu çözelti, p-aminobenzoikasıit çözeltisine damla damla katılmıştır. 15 dk’lık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan p-aminobenzoikasıit, 40 mL Sefaroz-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edilmiştir. 1 M NaOH ile pH 9,5’a çıkartılarak sabit tutulmuş ve karışım 3 saat oda sıcaklığında yavaşça karıştırılmıştır. Daha sonra 1 L distile su ve ardından 200 mL 0,05 M Tris- SO_4 (pH 7,4) tamponu ile yıkanmış ve aynı tamponda muhafaza edilmiştir. Bu süre sonunda, Şekil 3.1.’de şematize edildiğı gibi, renksiz olan çıkış maddelerinden kiremit renkli bir jel elde edilmiştir [69].

3.3.1.2.4. Saflaştırma işlemi

Yukarıda hazırlanışı anlatılan afinite kromatografisi kolon dolgu maddesi, çilek meyvesinden hazırlanan homojenattan proteaz enziminin saflaştırılması amacıyla kullanılmıştır. Kolon dolgu maddesi 1,3 × 15 cm boyutlarına sahip cam kolona yavaşça doldurulup dolgu maddesinin iyice çöküp paketlenmesi için kolon boşaltma musluğu kapalı vaziyette oda sıcaklığında bir süre inkübe edilmiştir. Dolgu maddesi pakettlendikten sonra pH’ı 6,6 olan dengeleme tamponu (%10 DMSO, %0,5 n-bütanol, 0,1 M KCl, 1 mM EDTA içeren 0,05 M Na_3PO_4 tamponu) kolondan geçirilerek dengelenmiştir. Ham enzim ekstraktı pH 7 fosfat tamponuyla 1/3 oranında seyreltilerek kolona yüklenmiştir. Yüklemenin ardından kolon pH’ı 6,6 olan yıkama tamponuyla (%10 DMSO, %0,5 n-bütanol ve 0,1 M KCl içeren 0,05 M Na_3PO_4 tamponu) yıkanarak enzimin kolon dolgu maddesine bağlanması ve diğer safsızlıkların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işleminin ardından pH’ı 6,6 olan

elüsyon tamponu (0,5 mM MnCl_2 , %10 DMSO, %0,5 n-bütanol, 0,1 M KCl, 1 mM EDTA içeren 0,05 M Na_3PO_4 tamponu) kolondan geçirilerek proteaz enzimi elüe edilmiştir. Elüatlar 36 mL/saat akış hızıyla 3 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanmış ve tüpler hızlıca buz üzerine alınarak soğuk kalması sağlanmıştır. Kolonun dengelenmesinden sonraki tüm işlemler 4 °C'de gerçekleştirilmiştir [69].



Şekil 3.1. Kolon dolgu maddesinin toplu sentez reaksiyonları [69]

3.3.1.3. Proteaz enzimi aktivite tayini

Çilek proteazının aktivitesi, Takami ve ark. tarafından tarif edildiği gibi, yöntem modifiye edilerek ölçülmüştür [70]. Proteolitik aktivite tayininde substrat olarak

BSA (sığır serum albumini) kullanılmıştır. BSA substrat çözeltisi, enzim ekstraktı için uygun pH'daki tampon çözeltide çözülerek hazırlanmıştır. Bu amaçla BSA 0,1 M pH 6 fosfat tamponunda çözülmüştür. Belli miktardaki BSA çözeltisi ve enzim çözeltisi, tampon çözeltiyle toplam hacim 3 mL'ye tamamlandıktan sonra, vortekslenerek iyice karıştırılmıştır. Enzim çözeltisi substrat çözeltisine ilave edilir edilmez reaksiyon başlar. Kör deneme için ise tampon ve substrat çözeltisi karıştırılmıştır. Bunun ardından tüpler hemen 40 °C'deki su banyosuna alınıp 1 saat inkübe edilmiştir. Bir saatlik reaksiyonun ardından 1,5 mL %10'luk TCA (trikloroasetik asit) çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Oda sıcaklığında 15 dk'lık inkübasyonun ardından karışım 5000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Ele geçen santrifüj at süzgeç kağıdıyla filtrelendikten sonra spektrofotometrik ölçümle süpernatant içindeki parçalanmış ürünlerin konsantrasyonu belirlenmiştir.

Spektrofotometrik ölçüm için 1 mL süpernatant, 2,5 mL 0,4 M Na₂CO₃ ve 0,5 mL iki kez distile su ile seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Süre bitiminde oluşan mavi rengin şiddeti 660 nm'de köre karşı absorbansın (OD₆₆₀) ölçülmesi ile belirlenmiştir.

Proteaz aktivitesi, daha önce oluşturulan standart tirozin grafiği kullanılarak aşağıda verilen eşitlik (Denklem 3.1) ile hesaplanmıştır:

$$\text{Enzim Aktivitesi (U mL}^{-1} \text{ dk}^{-1}) = \frac{\frac{OD_{660}}{E_{gltm}} \times \text{Reaksiyon Hacmi (mL)} \times \text{Seyrelme Faktörü}}{\text{Enzim Çözeltisinin Hacmi (mL)} \times \text{Reaksiyon Süresi (dk)}} \quad (3.1)$$

Bir birim proteaz aktivitesi (1 U); reaksiyon koşullarında dk'da 1 µg tirozin üretebilmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.3.1.4. Protein miktarı tayini

Enzim örneklerindeki protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir [71] ve standart olarak BSA kullanılmıştır.

3.3.1.5. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü ve molekül ağırlığı tayini

SDS-PAGE, çilek proteazının saflığının kontrolü ve molekül ağırlığının belirlenmesi amacıyla, Laemmli tarafından tarif edildiği gibi, %5'lik (a/h) yükleme jeli ve %15'lik (a/h) ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir [72]. Ayırma jeli bileşenleri karıştırılıp cam plakalar arasında dondurulduktan sonra yükleme jeli bileşenleri karıştırılıp plakalar arasına dökülmüş ve üst kısmına tarak yerleştirilip donmaya bırakılmıştır. Jel bileşenleri ve kullanılan miktarları Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. SDS-PAGE ayırma jeli ve yükleme jeli bileşenleri

Bileşenler	Ayırma Jeli (%15)	Yükleme Jeli (%5)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl, pH= 6,8)	---	1,25 mL
Ayırma Jeli tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH= 8,8)	2,6 mL	---
SDS (%10, a/h)	0,1 mL	0,05 mL
Akrilamid/Bisakrilamid (%30/%0,8, a/h)	5 mL	0,67 mL
H₂O	2,2 mL	2,975 mL
APS (%10, a/h)	0,1 mL	0,05 mL
TEMED	10 µL	0,005 mL

Her iki jel de tamamen donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirilip tank yürütme tamponuyla doldurulmuştur. Saflaştırılmış enzim ve standart proteinler 1'e 1,5 oranında numune tamponu ile karıştırılıp 100 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Denatürasyonun ardından tüm örnekler kuyucuklara yüklenip, tank kapatılıp sistem çalıştırılmıştır. Yürütme işlemi 20 mA'de yapılmıştır. Yürütme işlemi bittikten sonra jel, plakalar arasından dikkatlice çıkartılıp boyama çözeltisiyle hafifçe çalkalanarak gece boyunca boyanmıştır. Ardından, boyanmış jel boya giderme çözeltisinde protein

bantları görünür hale gelene kadar bekletilmiştir. Bu işlem esnasında boya giderme çözeltisi birkaç saatte bir sürekli değiştirilmiştir. Numune tamponu; Bromofenol blue (6 mg), Tris tamponu (0,9 mL, 1 M, pH 6,8), gliserol (3,75 mL), SDS (4,5 mL, %10) ve distile su (2,1 mL) karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 350 µL eppendorf tüplerine aktarılır ve kullanılacağı zaman tüplere 150 µL β–merkapto etanol eklenir. Boyama çözeltisi 125 mL metanol içerisinde 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R250 çözüldükten sonra 25 mL asetik asit ve 100 mL distile su ilave edilerek hazırlanmıştır.

3.3.1.6. Enzim kinetiği

Enzimin maksimum hızının (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitinin (K_m) bulunması için gerçekleştirilen kinetik çalışmalarda değişen konsantrasyonlarda bir seri BSA çözeltisi $[S]$ kullanılmıştır. Enzimin V_{max} ve K_m değeri tayin edilirken spektrofotometrik olarak 660 nm'deki absorbans artışından faydalanılmıştır. Ardından, bölüm 3.3.1.3.'de anlatıldığı gibi enzim aktivitesi ünite (U) cinsinden hesaplanmıştır (V). Bu aktivite değerleri Michaelis-Menten ($[S]$ 'ye karşı V) ve Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/[S]$ 'ye karşı $1/V$) yerine konularak K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur [73].

3.3.1.7. Saflaştırılan proteaz enziminin doğal ve modifiye substratlara karşı spesifikliğin belirlenmesi

Çilek meyvesinden saflaştırılan proteaz enziminin bazı doğal ve modifiye substratların varlığındaki aktivitesinin tayini için; kazein, azokazein, BSA, jelatin ve hemoglobin 0,1 M pH 6 fosfat tamponunda, %0,6 (a/h)'lık konsantrasyonda hazırlanmıştır. Substrat çözeltisi (2500 µL), seyreltik enzim çözeltisiyle (500 µL) karıştırılıp bölüm 3.3.1.3.'de belirtilen yöntemle göre aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek aktivite gösteren substratın aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş ve diğer substratlarla ölçülen aktiviteler bu değere oranlanarak % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.3.1.8. Saflaştırılan proteaz enziminin p-nitroanilid (p-NA) konjuge sentetik substratlara karşı spesifikliğinin belirlenmesi

Çilek meyvesinden saflaştırılan proteaz enziminin bazı sentetik substratlara karşı spesifikliğini belirlemek amacı ile p-nitroanilid ile konjuge edilmiş sentetik peptid substratları kullanılmıştır. Bu amaçla, çilek proteazının L-Leu-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, N α -Benzoyl-DL-Arg-pNA (DL-BAPNA) ve N-Suc-L-Phe-pNA olmak üzere dört farklı p-NA konjuge sentetik substratına karşı spesifikliği araştırılmıştır. Her bir substratın DMSO'daki stok çözeltisi kullanım sırasında taze olarak hazırlanmıştır. Substrat çözeltisi (0,05 mL) ile pH 6 fosfat tamponu çözeltisi (0,75 mL, 0,1 M) ile karıştırılarak 40 °C'de 10 dk süre ile ön inkübasyona tabii tutulmuştur. Süre bitiminde üzerine 0,02 mL enzim çözeltisi ilave edilen reaksiyon karışımı 40 °C'da 20 dk süre ile inkübe edilmiştir. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 0,1 M pH 6 fosfat tamponu çözeltisi bulunduran reaksiyon karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımının üzerine 0,2 mL %2'lik asetik asit çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Oluşan sarı rengin şiddeti 410 nm'de köre karşı absorbansın ölçülmesi ile belirlenmiştir.

Reaksiyon çözeltilerindeki proteaz aktivitesi aşağıda verilen eşitlik (Denklem 3.2) ile hesaplanmıştır (ϵ : molar absorpsiyon katsayısı olup değeri 9780 M⁻¹cm⁻¹'dir).

$$\text{Enzim Aktivitesi} = \frac{\text{Reaksiyon Çözeltisinin Hacmi (mL)} \times \text{Absorbans}}{\text{Enzim Çözeltisinin Hacmi (mL)} \times \epsilon \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)} \times \text{Işık yolu (cm)} \times \text{Süre (dk)}} \quad (3.2)$$

Bir birim proteaz aktivitesi (1 U); reaksiyon koşullarında dk'da 1 μ mol p-NA üretebilmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.3.1.9. Proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi

Çilek meyvesinden saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 500 μ L seyreltik enzim çözeltisi ile 0,1 M pH 6 fosfat tamponunda hazırlanmış %0,6'lık (a/h) 2500 μ L BSA çözeltisi karıştırılmış ve 30–75 °C aralığındaki su

banyolarında 1 saat inkübasyona bırakılıp her bir sıcaklık değeri için bölüm 3.3.1.3.'de belirtilen yönteme göre aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiş ve hesaplanan diğer aktivite değerleri en yüksek aktivite değeriyle oranlanarak % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. Her sıcaklık değeri için hesaplanan % bağıl aktivite değeri o sıcaklığa karşı grafiğe geçirilerek enzimin optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir.

3.3.1.10. Proteaz enziminin termal kararlılığının belirlenmesi

Saf enzimin termal kararlılığının belirlenmesi amacıyla 500 µL seyreltik enzim çözeltisi 40 °C ile 70 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde belirli bir süre inkübe edilmiş ve ardından enzim çözeltisinin aktivitesi bölüm 3.3.1.3.'de verilen proteaz aktivite tayin yöntemine göre belirlenmiştir. İnkübe edilen enzim çözeltilerinin aktivitesi pH 6 ve 40 °C'da (standart aktivite tayini) tayin edilen aktivite değerine oranlanarak % kalan aktivite olarak hesaplanmıştır. Her bir sıcaklık değeri için hesaplanan % kalan aktivite değeri o sıcaklığa karşı grafiğe geçirilerek enzimin termal kararlılık profili belirlenmiştir. Termal kararlılık denemesi için, enzim çözeltisi 40 °C'de 3 saat inkübasyona bırakılmış ve her 60 dk'da bir belirli bir hacim enzim ayrılarak aktivite tayini yapılmıştır; 50 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmış ve her 30 dk'da bir aktivitesine bakılmıştır; 60 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmış ve 15 dk'lık periyotlarla aktivite tayini yapılmıştır; 70 °C'de ise 30 dk inkübasyona bırakılmış ve her 5 dk'da bir aktivitesi ölçülmüştür.

3.3.1.11. Proteaz enziminin optimum pH'ının belirlenmesi

Çilek proteazının optimum pH değerini belirlemek için, enzim aktivitesi yedi farklı pH değerinde ölçülmüştür. Denemede 3 ile 9 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tampon çözeltiler kullanılmıştır. pH 3-6 aralığında 0,1 M sitrat tamponu, pH 6-8 aralığında 0,1 M fosfat tamponu ve pH 8-9 aralığında 0,1 M Tris tamponu kullanılmıştır. BSA çözeltisi [%0,6 (a/h), distile suda], seyreltik enzim çözeltisi ve ilgili tampon çözelti karıştırılıp (reaksiyon toplam hacmi: 3 mL) 40 °C'deki su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir. Enzim aktivitesi, her bir pH değeri için standart

koşullar altında belirlenmiştir. En yüksek aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiş ve hesaplanan diğer aktivite değerleri en yüksek aktivite değeriyle oranlanarak % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. Her bir pH değeri için hesaplanan % bağıl aktivite değeri o pH'a karşı grafiğe geçirilerek enzimin optimum pH değeri belirlenmiştir.

3.3.1.12. Proteaz enziminin pH kararlılığının belirlenmesi

Çilek meyvesinden saflaştırılan proteaz enziminin pH kararlılığının incelenmesi çalışmasında, proteaz enzimi farklı pH'lardaki (pH 3-9) tamponlar içerisinde inkübe edilmiş ve daha sonra aktivitesi ölçülmüştür. Enzimin pH kararlılığını belirlemek için, 250 µL enzim çözeltisi ile 2250 µL farklı pH'lardaki tampon çözeltisi karıştırılmış ve oda sıcaklığında 3 saat ön-inkübasyona bırakılmıştır. 3 saat sonunda, her bir pH için aktivite tayini bölüm 3.3.1.3.'de belirtildiği gibi yapılmıştır. İnkübasyon öncesinde ölçülen aktivite değerleri %100 olarak kabul edilmiş, inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi olarak hesaplanmış ve % kalan aktivite olarak verilmiştir.

3.3.1.13. Bazı metal iyonlarının saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Bu deneme, çilek meyvesinden saflaştırılan proteaz enziminin bazı metal iyonlarının varlığında aktivitesindeki değişimi incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bunun için, tek değerlikli metal iyonlarından K^+ ve Na^+ , iki değerlikli metal iyonlarından Ca^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ve ayrıca üç değerlikli metal iyonlarından Fe^{3+} , Al^{3+} iyonları denenmiştir. Ni^{2+} 'in sülfatlı, Al^{3+} 'un nitratlı, diğer tüm metallerin klorürlü tuzları 0,1 M pH 6 fosfat tamponunda son konsantrasyonları 2 ve 5 mM olacak şekilde kullanılmıştır. 500 µL seyreltik enzim çözeltisi hazırlanan çözeltilerin 500 µL'si ile karıştırılıp oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İçinde metal iyonu bulundurmayan bir örnek ise kontrol denemesi olarak aynı şartlarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında aktivite tayini bölüm 3.3.1.3.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Deneme sonunda enzim aktivite seviyeleri

hesaplanırken kontrol numunesinin aktivitesi %100 olarak alınmış ve diğer örneklerin aktiviteleri kontrol denemesinin aktivitesine oranlanıp % kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır.

3.3.1.14. Bazı organik çözücülerin saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Bu deneme, çilek meyvesinden saflaştırılan proteaz enziminin bazı organik çözücülerin varlığında kararlılığındaki değişimi incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bunun için, organik çözücü olarak DMSO, etanol, metanol, aseton, asetonitril, etil asetat ve 2-propanol kullanılmıştır. Denemede, 300 µL organik çözücü 900 µL seyreltik enzim çözeltisiyle 40 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. İçinde organik çözücü bulundurmeyen bir örnek ise kontrol denemesi olarak aynı şartlarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında bölüm 3.3.1.3.’de belirtilen yöntemle göre aktivite tayini yapılmıştır. İçinde organik çözücü bulunmayan kontrol numunesinin aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş ve diğer örneklerin % kalan aktiviteleri buna göre hesaplanmıştır.

3.3.1.15. Bazı inhibitörlerin saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Çilek meyvesinden saflaştırılan proteaz enziminin hangi proteaz sınıfına dahil olduğunu tespit etmek amacıyla enzim; serin proteaz inhibitörleri olan PMSF (1 ve 5 mM), TPCK (1 ve 3 mM) ve TLCK (1 ve 3 mM), metaloproteaz inhibitörleri olan EDTA (1 ve 5 mM) ve 1,10-fenantrolin (1 ve 5 mM), sistein proteaz inhibitörü olan iyodoasetamid (IAA, 1 ve 5 mM) ve aspartik proteaz inhibitörü olan pepstatin A (1 ve 5 mM) inhibitörleri ile muamele edilmiştir. EDTA ve iyodoasetamid inhibitörlerinin stok çözeltileri 0,1 M pH 6 fosfat tamponunda, PMSF ve 1,10-fenantrolin inhibitörlerinin stok çözeltileri saf etanolde, TLCK ve TPCK inhibitörlerinin stok çözeltileri metanolde, Pepstatin A inhibitörünün stok çözeltisi ise DMSO’da hazırlanmıştır.

İnhibitör etkisi denemesinde enzim çözeltisi hazırlanan inhibitör çözeltileriyle karıştırılıp 40 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. İnhibitör bulunmayan kontrol numunesi de aynı şartlarda inkübe edilmiştir ve inkübasyon sonrası örneklerle standart koşullar altında aktivite tayini yapılmıştır. İçinde inhibitör bulunmayan kontrol numunesinin aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş ve diğer örneklerin aktiviteleri buna göre % kalan aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.3.2. Çilek proteazının immobilizasyonu

Çilek proteazının immobilizasyonu için Ca-aljinat jelde tutuklama yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak enzimin immobilizasyonu için en uygun koşullar belirlenmiş ve sonrasında bu koşullar oluşturularak immobilize edilen ham proteaz enzimi karakterize edilmiştir.

3.3.2.1. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu

3.3.2.1.1. Aljinat konsantrasyonunun optimizasyonu

İlk olarak 2,5 mL çilek meyvesi ham ekstraktı ile 2,5 mL pH 6 fosfat tamponu karıştırılmıştır. Bu şekilde elde edilen enzim çözeltisi için sırasıyla %1, 2, 3 ve 4’lük oranlarda olacak şekilde 0,05; 0,1; 0,15 ve 0,2 g sodyum aljinat tartılıp enzim çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Karıştırmayla oluşan gaz kabarcıklarının giderilmesi için bir saat kadar buzdolabında bekletilmiştir. Küt uçlu, 5 mL’lik bir enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan, önceden iyice soğutulmuş 20 mL %2’lik CaCl_2 çözeltisine damlatılmıştır. Bu vesile ile oluşan, enzimin tutuklandığı Ca-aljinat immobilize kürecikler iki saat buzdolabında bekletilip olgunlaştırıldıktan sonra süzülerek distile suyla yıkanmıştır. Süzüntü ve yıkama suyundan oluşan karışım aktivite ve protein tayini için saklanmıştır. Küreciklerin proteaz aktivitelerine bakılmıştır. Aktivite ve protein miktarı, belirli miktarda immobilize kürecik kullanılarak standart koşullar altında belirlenmiştir. Optimizasyon amacıyla, spesifik aktivite (U/mg protein) hesaplanarak sonuçlar kıyaslanmıştır.

3.3.2.1.2. CaCl_2 konsantrasyonunun optimizasyonu

Sırasıyla %1, 2, 3 ve 4'lük olmak üzere dört farklı CaCl_2 çözeltisi hazırlanmıştır. 5 mL enzim çözeltisinde 0,1 g sodyum aljinat çözülerek hazırlanan %2'lik enzim-aljinat karışımlarının her biri bir saat buzdolabında bekletildikten sonra küt uçlu bir enjektör yardımıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan önceden iyice soğutulmuş dört farklı konsantrasyondaki CaCl_2 çözeltisine damlatılmıştır. Oluşan immobilize kürecikler iki saat buzdolabında bekletildikten sonra süzülerek distile suyla yıkanmıştır. Süzüntü ve yıkama suyundan oluşan karışım aktivite ve protein tayini için saklanmış, küreciklerin ise proteaz aktivitesi belirlenmiştir. Aktivite ve protein miktarı, belirli miktarda immobilize kürecik kullanılarak standart koşullar altında belirlenmiştir. Optimizasyon amacıyla, spesifik aktivite hesaplanarak sonuçlar kıyaslanmıştır.

3.3.2.1.3. Enzim miktarı optimizasyonu

İmmobilizasyon işleminde kullanılacak olan enzim miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisini incelemek amacıyla ham ekstrakt farklı oranlarda seyreltilerek immobilizasyonda kullanılmıştır. Seyreltme faktörü (SF) 1, 2, 3 ve 4 olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda enzim çözeltileri hazırlanarak immobilizasyon işlemi tekrarlanıp her bir seyreltme faktörü için elde edilen sonuçlar kıyaslanmıştır. Seyrelmelerde pH 6 fosfat tamponu kullanılmıştır. Her birinde %2'lik olacak şekilde 0,1 g sodyum aljinat çözülerek bir saat buzdolabında bekletilmiştir. Enzim-aljinat karışımları ayrı ayrı 5 mL'lik küt uçlu bir enjektör yardımıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan önceden iyice soğutulmuş %3'lük CaCl_2 çözeltilerine damlatılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda enzim içeren immobilize kürecikler iki saat buzdolabında bekletildikten sonra süzülerek distile suyla yıkanmıştır. Süzüntü ve yıkama suyundan oluşan karışım aktivite ve protein tayini için saklanmış, küreciklerin ise proteaz aktivitesi belirlenmiştir. Aktivite ve protein miktarı, belirli miktarda immobilize kürecik kullanılarak standart koşullar altında belirlenmiştir. Optimizasyon amacıyla, spesifik aktivite hesaplanarak sonuçlar kıyaslanmıştır.

3.3.2.1.4. Kürecik miktarı optimizasyonu

Kürecik miktarı optimizasyonu tayininde, aktivite ölçümünde kullanılacak en uygun immobilize kürecik miktarının saptanması hedeflenmiştir. İmmobilizasyon aşaması daha önceki bölümlerde anlatıldığı şekilde; 4 kat seyreltilmiş ham ekstrakt (SF=4), %2'lik sodyum aljinat ve %3'lük CaCl_2 çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen küreciklerden 0,1; 0,2; 0,3 ve 0,4 g tartılmış ve ayrı ayrı aktivite tayini yapılmıştır. Aktivite ve protein miktarı, belirli miktarda immobilize kürecik kullanılarak standart koşullar altında belirlenmiştir. Optimizasyon amacıyla, spesifik aktivite hesaplanarak sonuçlar kıyaslanmıştır.

3.3.2.2. Çilek proteazı ile birlikte immobilize edilen Co^{2+} İyonlarının aktivite üzerine etkisinin incelenmesi

Optimizasyon çalışmaları sonunda çilek meyvesi proteaz enziminin Ca-aljinat küreciklerine immobilizasyonu için gerekli bileşenlerin en uygun konsantrasyonu belirlenmiştir. Bileşenlerin optimum konsantrasyonları kullanılarak enzimin immobilizasyonu esnasında ortama Co^{2+} iyonları eklenmiş ve Co^{2+} iyonları da enzimle beraber oluşan küreciklerde immobilize edilmiştir. Bu amaçla; 5 mL 4 kat seyreltilmiş ham ekstrakt (SF=4) enzim çözeltisi hazırlanırken çözelti içerisinde son konsantrasyonu 1, 2 ve 5 mM olacak şekilde CoCl_2 çözölmüş ve bu karışım yukarıda anlatıldığı şekilde immobilize edilmiştir. Süzüntü ve yıkama suyundan oluşan karışım aktivite ve protein tayini için saklanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda Co^{2+} içeren her bir immobilize enzim için 0,4 g kürecik kullanılarak proteaz aktivitesi belirlenmiş ve Co^{2+} içermeyen immobilize enzimle aktivitesi kıyaslanmıştır. Aktivite ve protein miktarı standart koşullar altında belirlenmiştir.

3.3.2.3. İmmobilizasyon veriminin ve etkinliğinin belirlenmesi

Enzim immobilizasyonunun başarısını belirlemek için sıklıkla kullanılan üç terim, “immobilizasyon verimi”, “immobilizasyon etkinliği” ve “aktivite geri kazanımı”dır. İmmobilizasyon verimi, immobilize edilen serbest enzim çözeltisinden toplam enzim

aktivitesinin yüzdesini tanımlamak için kullanılmalıdır (Denklem 3.3 ve Denklem 3.4) [74].

$$\text{Verim (\%)} = \frac{\text{immobilize enzimin aktivitesi}}{\text{başlangıç aktivitesi}} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\text{Verim (\%)} = \frac{\text{serbest enzimin toplam aktivitesi} - \text{süzüntünün toplam aktivitesi}}{\text{serbest enzimin toplam aktivitesi}} \times 100 \quad (3.4)$$

İmmobilize edilen enzimin aktivitesi ancak, immobilizasyondan sonra enzim çözeltisinin toplam kalan enzim aktivitesinin ölçülmesiyle ve bu aktivitenin enzimin toplam başlangıç aktivitesinden çıkarılmasıyla doğru bir şekilde belirlenebilir. Bazen immobilizasyon verimini belirlemek için protein ölçümleri kullanılmaktadır (Denklem 3.5). Bu hesaplama, farklı proteinlerin farklı immobilizasyon verimleri olabileceği için, özellikle ham protein karışımı immobilizasyon için kullanıldığında yanıltıcı olabilir. Bununla birlikte, serbest enzimde meydana gelebilecek bir deaktivasyonu bertaraf etmek ve immobilize edilmiş biyokatalizörün protein ve/veya enzim yükleme değerini (% , ağırlıkça) belirlemek için, hem enzim aktivitesini hem de süpernatantdaki protein konsantrasyonunu izlemek yararlı olabilmektedir [74].

$$\text{Verim (\%)} = \frac{\text{serbest enzimin toplam protein miktarı} - \text{süzüntünün toplam protein miktarı}}{\text{serbest enzimin toplam protein miktarı}} \times 100 \quad (3.5)$$

İmmobilizasyon başarısını tanımlamak için sıklıkla kullanılan ikinci terim, immobilizasyon etkinliği (Denklem 3.6). İmmobilizasyon etkinliği, immobilizatta gözlenen bağlı enzim aktivitesinin yüzdesini tanımlar [74].

$$\text{Etkinlik (\%)} = \frac{\text{gözlenen aktivite}}{\text{immobilize enzimin aktivitesi}} \times 100 \quad (3.6)$$

İmmobilizasyon başarısını tanımlamak için kullanılan üçüncü terim, aktivite geri kazanımı'dır (Denklem 3.7). Toplam immobilizasyon sürecinin başarısı hakkında fikir veren aktivite geri kazanımı terimi, immobilizasyon etkinliği ile immobilizasyon veriminin çarpılmasıyla elde edilir. Aktivite geri kazanımı değeriyle

immobilizatın aktivitesi, serbest enzimin toplam başlangıç aktivitesi ile kıyaslanmış olur [74].

$$\text{Aktivite geri kazanımı (\%)} = \frac{\text{gözlenen aktivite}}{\text{başlangıç aktivitesi}} \times 100 \quad (3.7)$$

Optimizasyon işlemlerinin ardından belirlenen optimum koşullarda çilek proteazı Ca-aljinat jelde tutuklanarak immobilize edilmiştir. Gerçekleştirilen immobilizasyon işleminin başarısının değerlendirilmesi için ise immobilizasyon verimi, immobilizasyon etkinliği ve aktivite geri kazanımı yukarıda belirtilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3.2.4. İmmobilize enzimin karakterizasyonu

3.3.2.4.1. İmmobilize enzimin optimum sıcaklık ve termal kararlılığının belirlenmesi

İmmobilize proteaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için belli miktarda immobilize kürecik ile 0,1 M pH 6 fosfat tamponunda hazırlanmış %0,6'lık (a/h) BSA çözeltisi karıştırılmış ve 30–75 °C aralığındaki su banyolarında 1 saat inkübasyona bırakılıp her bir sıcaklık değeri için bölüm 3.3.1.3.'de belirtilen yönteme göre aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiş ve hesaplanan diğer aktivite değerleri en yüksek aktivite değeriyle oranlanarak % bağıl aktivite olarak belirlenmiştir. Her sıcaklık değeri için hesaplanan % bağıl aktivite değeri o sıcaklığa karşı grafiğe geçirilerek enzimin optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir.

İmmobilize enzimin termal kararlılığının belirlenmesi amacıyla belli miktarda immobilize kürecik 40 °C ile 70°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde belirli bir süre inkübe edilmiş ve ardından immobilize enzimin aktivitesi bölüm 3.3.1.3.'de verilen proteaz aktivite tayin yöntemine göre belirlenmiştir. İnkübe edilen küreciklerin aktivitesi pH 6'da ve her bir sıcaklık değerinde (standart aktivite tayini) ön inkübasyon olmadan tayin edilen aktivite değerine oranlanarak % kalan aktivite

olarak hesaplanmıştır. Her bir sıcaklık değeri için hesaplanan % kalan aktivite değeri o sıcaklığa karşı grafiğe geçirilerek immobilize enzimin termal kararlılık profili belirlenmiştir.

Termal kararlılık denemesi için, immobilize kürecikler 40 °C'de 3 saat inkübasyona bırakılmış ve her 60 dk'da bir belirli bir miktar enzim ayrılarak aktivite tayini yapılmıştır; 50 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmış ve her 30 dk'da bir aktivitesine bakılmıştır; 60 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmış ve 15 dk'lık periyotlarla aktivite tayini yapılmıştır; 70 °C'de ise 30 dk inkübasyona bırakılmış ve her 5 dk'da bir aktivitesi ölçülmüştür.

3.3.2.4.2. İmmobilize enzimin optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesi

İmmobilize proteaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi için belli miktarda immobilize kürecik ile %0,6'lık (a/h) BSA çözeltisi (distile suda hazırlanmış) farklı tampon çözeltiler içerisinde karıştırılmış ve 40 °C'deki su banyosunda 1 saat inkübasyona bırakılıp her bir pH değeri için bölüm 3.3.1.3.'de belirtilen yöntemle göre aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiş ve hesaplanan diğer aktivite değerleri en yüksek aktivite değeriyle oranlanarak % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. Her pH değeri için hesaplanan % bağıl aktivite değeri o pH değerine karşı grafiğe geçirilerek immobilize enzimin optimum pH değeri belirlenmiştir.

İmmobilize proteaz enziminin pH kararlılığının incelenmesi çalışmasında, immobilize kürecikler farklı pH'lardaki tamponlar içerisinde inkübe edilmiş ve daha sonra aktivitesi ölçülmüştür. Denemede 3 ile 9 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tampon çözeltiler kullanılmıştır. pH 3-6 aralığında 0,1 M sitrat tamponu, pH 6-8 aralığında 0,1 M fosfat tamponu ve pH 8-9 aralığında 0,1 M Tris tamponu kullanılmıştır.

Enzimin pH kararlılığını belirlemek için, belli miktarda immobilize kürecik ile farklı pH'lardaki tampon çözeltiler karıştırılmış ve oda sıcaklığında 3 saat ön-inkübasyona

bırakılmıştır. 3 saat sonunda, her bir pH için aktivite tayini bölüm 3.3.1.3.'de belirtildiği gibi yapılmıştır. İnkübasyon öncesinde ölçülen aktivite değerleri %100 olarak kabul edilmiş, inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi olarak hesaplanmış ve % kalan aktivite olarak verilmiştir.

3.3.2.4.3. İmmobilize enzimin kinetiği

İmmobilizasyon işlemi enzimin substratına olan afinitesini etkilediğinden immobilize enzim için BSA substratına ait kinetik değerler ayrıca hesaplanıp sonuçlar serbest enzimin sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlar, immobilizasyon işleminin enzimatik reaksiyonun kinetiğine etkisinin anlaşılması açısından önem taşımaktadır. İmmobilize enzimin kinetik sabitleri (K_m ve V_{max} değerleri) serbest enzim ile aynı şekilde tayin edilmiştir. Aradaki tek fark serbest enzim yerine immobilize küreciklerin kullanılmasıdır.

3.3.2.4.4. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

İmmobilizasyon işleminin en önemli getirisi enzimin tekrar tekrar kullanılabilmesidir. Tekrar kullanılabilirliğin hesaplanabilmesi için immobilize enzim bölüm 3.3.1.3.'de anlatıldığı gibi BSA ile reaksiyona sokulup reaksiyon sonunda aktivitesi hesaplanmıştır. Daha sonra bu reaksiyonda kullanılmış olan enzim 0,1 M pH 6 fosfat tampon çözeltisiyle yıkanmış ve tekrar aynı koşullarda BSA ile reaksiyona sokulup, reaksiyon sonunda aktivitesi hesaplanmıştır. Bu işlem arka arkaya tekrarlanmış ve enzimin her bir kullanımda aktivitesinin ne kadarını kaybettiği belirlenmiştir.

3.3.2.4.5. İmmobilize enzimin depolanma kararlılığı

Hem serbest hem de immobilize enzim küreciklerinin depolanma kararlılığı 4 °C ve 25 °C'de 8 haftalık inkübasyonla belirlenmiştir. Serbest ve immobilize çilek proteazı ayrı ayrı 0,1 M pH 6 fosfat tamponu içerisinde, belirtilen sıcaklık değerlerinde 8 hafta boyunca depolanmıştır.

Depolanmış immobilize enzim ve serbest enzimin aktivite değişimi toplam inkübasyon süresi boyunca haftada bir aktivite ölçümü yoluyla izlenmiştir. Her defasında, belirtilen sıcaklık değerlerinde depolanan enzim preparatları içerisinde bir miktar alınıp standart koşullarda aktivite ölçümü yapılmıştır. Hem serbest hem de immobilize enzim için kalan (%) aktivite değerleri başlangıç aktivitesine göre hesaplanmıştır.

3.3.3. Çilek proteazının uygulama alanlarının araştırılması

3.3.3.1. Çilek proteazının deterjan katkı maddesi olarak kullanımının araştırılması

3.3.3.1.1. Ağartıcı maddelerin, yüzey aktif maddelerin ve deterjanların enzim kararlılığı üzerindeki etkisi

Çilek ham enziminin (serbest ve immobilize) bir deterjan katkı maddesi olarak uygunluğu; SDS, Triton X-100, Tween 20, Tween 80, Brij 35 gibi bazı yüzey aktif maddelerin ve ayrıca hidrojen peroksit (H_2O_2) ve sodyum perborat ($NaBO_3$) gibi oksitleyici maddelerin varlığında kararlılığının test edilmesiyle belirlenmiştir. Proteaz enzimini (350 U/mL) içeren çilek ham ekstraktı 40 °C'de 1 saat boyunca bahsi geçen katkı maddeleri ile inkübe edilmiştir ve ardından % kalan aktivite değerleri standart koşullar altında belirlenmiştir. Herhangi bir katkı maddesi içermeyen, benzer koşullar altında inkübe edilen ham enzimin aktivitesi %100 olarak alınmıştır.

Bunun yanında çilek ham enziminin (serbest ve immobilize) ticari katı ve sıvı çamaşır deterjanları ile uyumluluğu da incelenmiştir. Çalışmada çilek proteazının A, B, C, D katı deterjanları ve E, F, G, H (deterjan isimleri harflerle kodlanmıştır) sıvı deterjanları varlığındaki kararlılığı test edilmiştir. Yıkama koşullarına benzer koşulları oluşturmak amacıyla; sıvı deterjanlar 100 kat, katı deterjanlar son konsantrasyonu 7 mg/mL olacak şekilde musluk suyunda seyreltilmiştir. Seyreltilen

deterjanlar, formülasyonlarında halihazırda bulunan endojen enzimleri inaktive etmek maksadıyla, çilek ham proteazı eklenmeden önce 80 °C'de 30 dk ısıtılmıştır. 350 U/mL'lik proteaz içeren ham enzim musluk suyunda seyreltilmiş çeşitli deterjan çözeltilerine ilave edilip 40 °C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir ve daha sonra enzim aktiviteleri standart koşullar altında belirlenmiştir. Bu amaçla aynı koşullar altında inkübe edilen deterjan içermeyen kontrol örneğinin enzim aktivitesi %100 kabul edilmiş ve deterjanla birlikte inkübe edilmiş örneklerin % kalan enzim aktivitesi değerleri kontrole oranlanarak hesaplanmıştır.

3.3.3.1.2. Yıkama performansının değerlendirilmesi

Çilek proteazının (serbest ve immobilize) yıkama performansının değerlendirilmesi amacıyla öncelikle temiz pamuklu bez parçaları (5 cm x 5 cm) ketçap, çikolata sosu ve barbekü sosu ile kirletilmiştir. Bu amaçla 100 µL ketçap, çikolata sosu ve barbekü sosu ayrı ayrı kumaş parçalarına uygulanmış ve sonrasında oda koşullarında 3 gün boyunca iyice kurutulmuştur. Ketçap ve barbekü sosu herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan, çikolata sosu ise ısıtılıp sıvılaştırıldıktan sonra kumaşlara uygulanmıştır. Sonraki aşamada soslarla kirletilen kumaş parçaları 40 °C'de yıkanmış ve durulanmıştır. Durulanan kumaş parçaları oda koşullarında kurutulduktan sonra sonuçlar görsel olarak incelenmiştir.

Yıkama çözeltisi olarak musluk suyu, deterjanlı musluk suyu ve enzim ilaveli deterjanlı musluk suyu ayrı ayrı denenmiştir. Yıkama performansı çalışması C katı deterjanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deterjanlı yıkama çözeltisi hazırlanırken katı deterjan musluk suyunda son konsantrasyonu 7 mg/mL olacak şekilde çözülmüştür. Enzim ilaveli olan yıkama çözeltisi hazırlanırken deterjan musluk suyunda çözüldükten sonra enzim ilavesi yapılmıştır (40 U/mL). Kirletilmiş kumaş parçaları, yukarıda belirtildiği gibi, 100 mL'lik yıkama çözeltileri içerisine alınmıştır. Yıkama çözeltilerini ve kumaş parçalarını içeren her bir erlen orbital çalkalayıcıda 150 rpm'de, 40 °C'de 60 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra bez parçaları çıkarılıp su ile durulanmış ve kurutulmuştur. Yıkanan kumaşların görsel incelemesi, lekelerin çıkarılmasında çilek proteaz enziminin etkisini göstermiştir.

3.3.3.2. Süt pıhtılaştırma aktivitesi (SPA)

Çilek ham enziminin (serbest ve immobilize) süt pıhtılaştırma (çöktürme) aktivitesi, Arima ve ark. tarafından geliştirilen metoda göre, bazı küçük değişiklikler yapılarak belirlenmiştir [75]. Her bir enzim örneği için 40 °C’de önceden ısısal olarak dengelenmiş olan 10 mL az yağlı pastörize süte (%0,02 CaCl₂ içeren) 1 mL ham enzim ekstraktı (veya ona denk miktarda protein içeren immobilize kürecik) ilave edilmiştir. Kontrol numunesi, süte enzim yerine 1 mL 0,1 M pH 7 fosfat tamponu eklenerek hazırlanmıştır. Karışım, pıhtılaşma gözleninceye kadar 40 °C’ye ayarlanmış kapalı orbital çalkalayıcıda 50 rpm çalkalama hızında inkübe edilerek, her bir enzim örneği için pıhtılaşmaya başlama süreleri ölçülmüştür. Kontrol numunesi de enzimli örneklerle aynı koşullarda inkübe edilerek pıhtılaşma olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bir birim (U) SPA, 40 °C’de 40 dk’da (2400 s) 10 mL az yağlı sütü pıhtılaştırmak için gereken protein miktarı (mg) olarak tanımlanmaktadır. SPA aşağıda verilen eşitlik (Denklem 3.8) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$SPA (U) = \frac{2400}{t} \times \frac{S}{E} \quad (3.8)$$

Burada t= çökme süresi (s); S= süt hacmi (mL); E= ekstrakt hacmi (mL)’ni ifade etmektedir.

3.3.4. İstatistiksel analiz

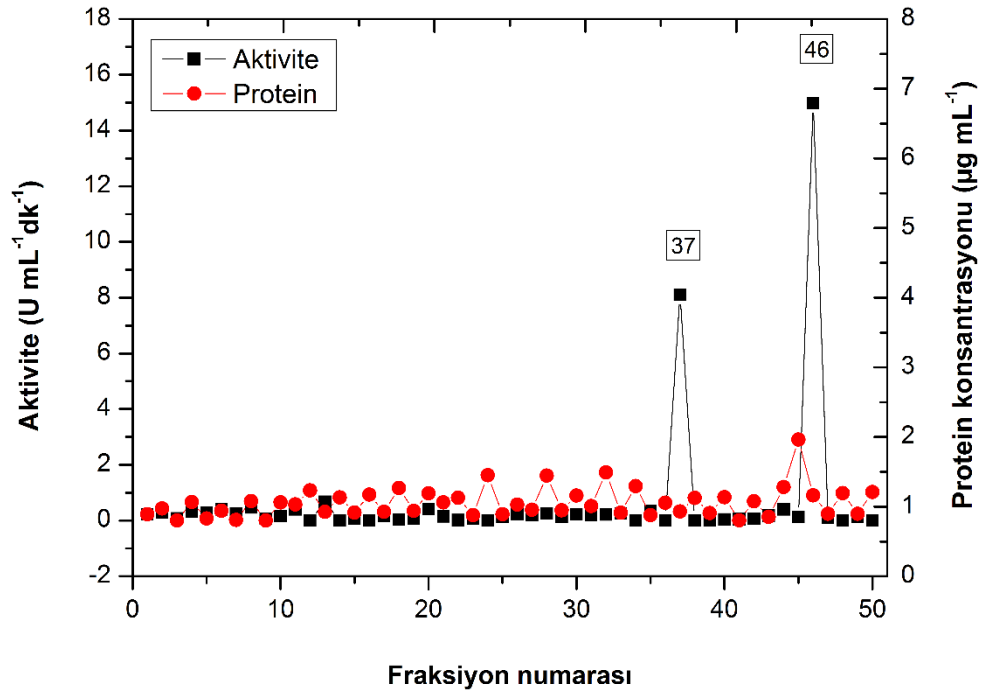
Tüm deneyler üç kez tekrar edilmiştir. Tüm sonuçlar ölçümlerin ortalama ± standart sapması olarak ifade edilmiştir. Standart sapmayı hesaplamak için OriginPro 8 programı (Northampton, Massachusetts, ABD) kullanılmıştır.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Çilek Meyvesinden İzole Edilen Proteaz Enziminin Saflaştırılması

Çilek meyvesinden izole edilen proteaz enzimi, Sefaroz-4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit afinite kromatografisi kullanılarak tek adımda saflaştırılmıştır. Afinite jelinde p-amino benzoik asit enzime spesifik olarak bağlanan kısmı oluştururken, tirozin ise jelin uzatma kolunu oluşturur. Kullanılan yöntemin avantajı, enzimin bir aşamada saflaştırılabilmesidir. Bunun yanında, çok düşük bir protein miktarının elde edilebilmesi gibi bir dezavantajı da mevcuttur.

Toplam 50 adet tüp içerisinde toplanan kolon elüsyonundan alınan fraksiyonlarda proteaz aktivitesi tayini ve Bradford yöntemiyle protein miktar tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.'de verilmiştir. Proteaz aktivitesi ve protein miktar tayininde kullanılan standart grafikler Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'de verilmiştir. Tüm fraksiyonlarda proteaz aktivitesi gözlenmiştir (aktivite tayininde 100 µL saf enzim kullanılmıştır). Toplanan bütün fraksiyonlar içerisinde, 37 ve 46 nolu fraksiyonlarda aktivite düzeyi yüksek, protein miktarı ise düşük olduğundan bu fraksiyonlarda en saf proteaz enzimi elüe edilmiştir. Fraksiyonların çoğunda protein miktarının nispeten yüksek, proteaz aktivite değerinin ise oldukça düşük sonuç vermesi; kolondan başka proteinlerin bu fraksiyonlarda elüe edildiğini göstermektedir, bu fraksiyonlarda saflık düşüktür.



Şekil 4.1. Çilek proteazının afinite kromatografisi fraksiyonlarının aktivite ve protein miktarı grafiği

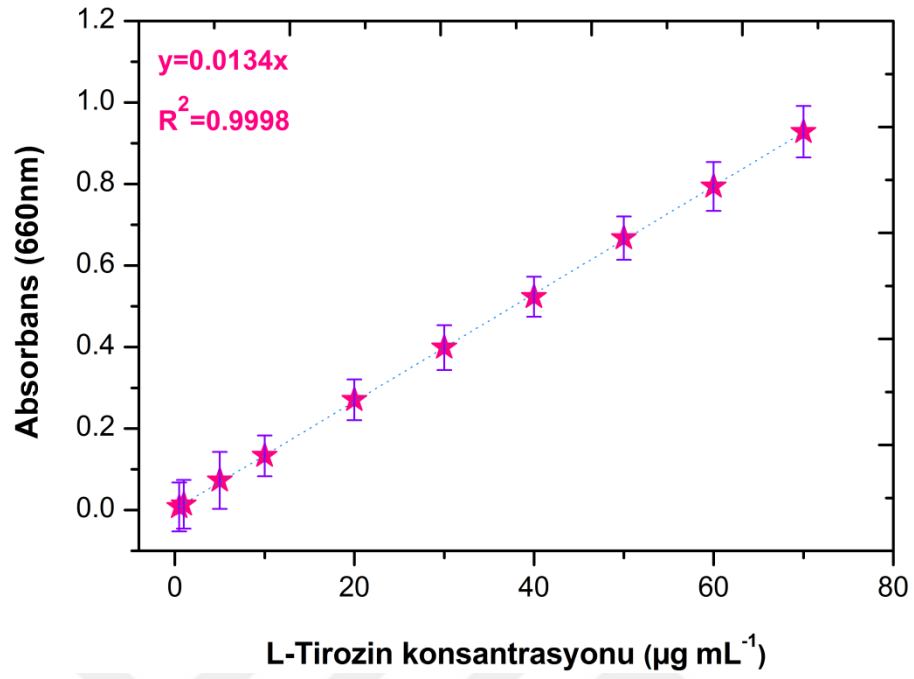
Tablo 4.1., çilek proteazının saflaştırma sonuçlarını özetlemektedir. Çilek meyvesinden izole edilen proteaz enziminin afinite kromatografisi ile ileri derecede saflaştırılması %38,37 saflaştırma verimi ve 395,6 saflaştırma katsayısı ile gerçekleştirilmiştir.

Literatürde proteaz enziminin saflaştırılması amacıyla afinite kromatografisinin kullanımına örnek gösterilebilecek başka çalışmalar da mevcuttur. 38,35 kDa molekül ağırlığına sahip *Aeribacillus pallidus* C10 proteazı %19,56 saflaştırma verimi ile afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan bir serin proteazdır [76]. Başka bir çalışmada, *Tenodera sinensis* (Çin peygamber devesi) serin proteazının, spesifik aktivitesinde 5120 kat artış ile afinite kromatografisi ile saflaştırıldığı bildirilmiştir [16].

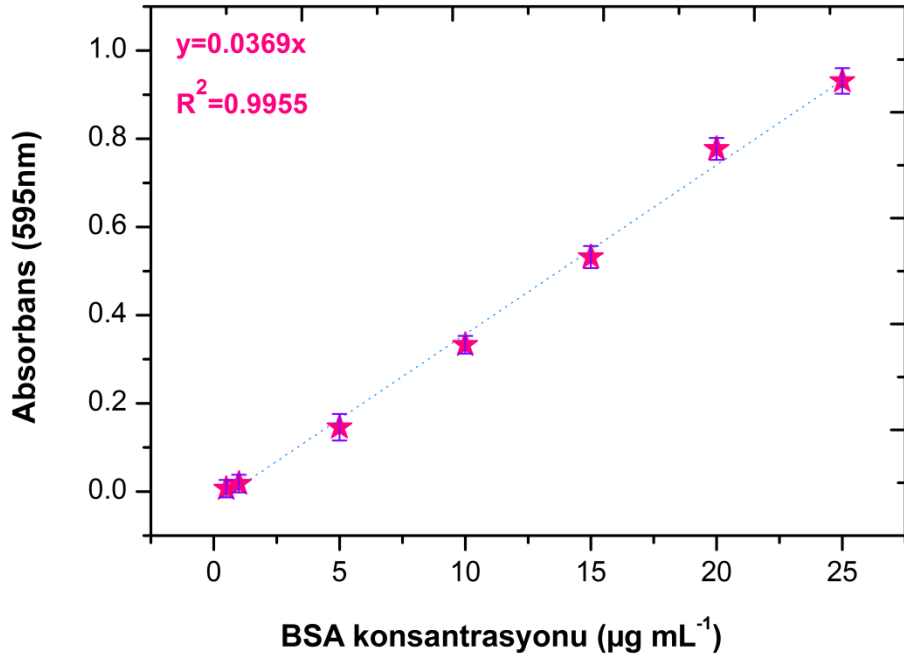
Tablo 4.1. Çilek proteaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

Adım	V (mL)	Aktivite (U mL ⁻¹ dk ⁻¹)	Toplam Aktivite (U)	Protein (mg mL ⁻¹)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U mg ⁻¹)	Saflaştırma Verimi (%)	Saflaştırma Katsayısı
Ham ekstrakt	100	38±0,99	3800±14,14	4,175±0,11	417,5±2,69	9,1±0,02	100	1
Saf enzim	15	97,2±0,85	1458±1,41	0,027±0,01	0,405±0,002	3600±15,27	38,37	395,6

*± değerler üçlü ölçümlerin standart sapma değerini ifade etmektedir.



Şekil 4.2. Aktivite hesaplanmasında kullanılan L-tirozin standart grafiği

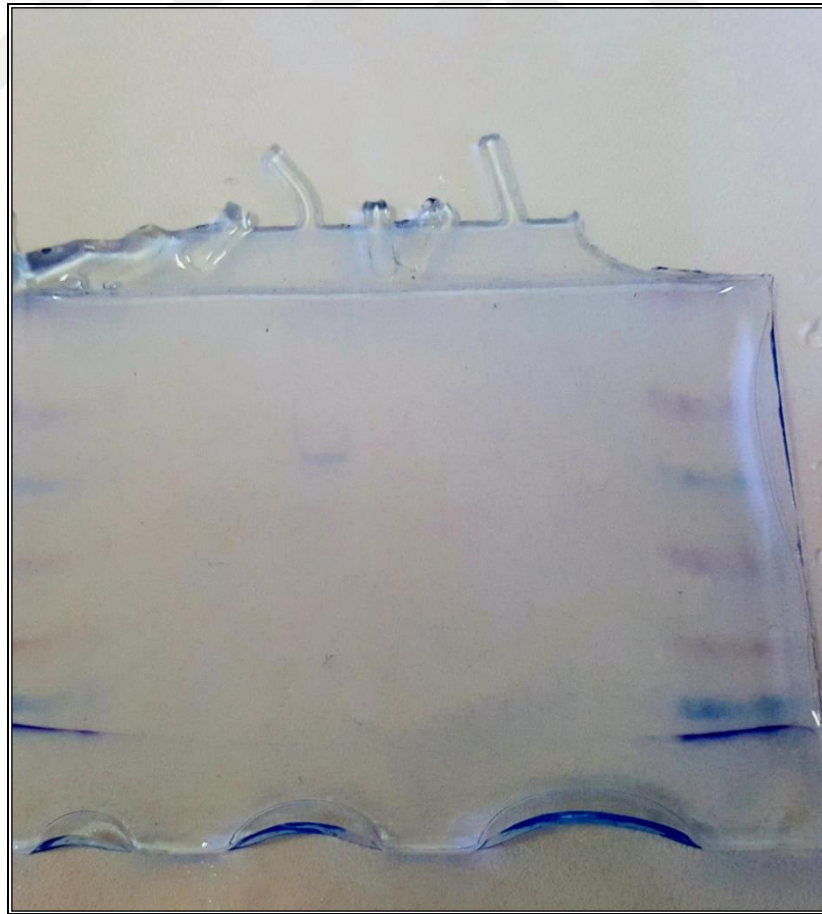


Şekil 4.3. Protein miktarı hesaplanmasında kullanılan Bradford standart grafiği

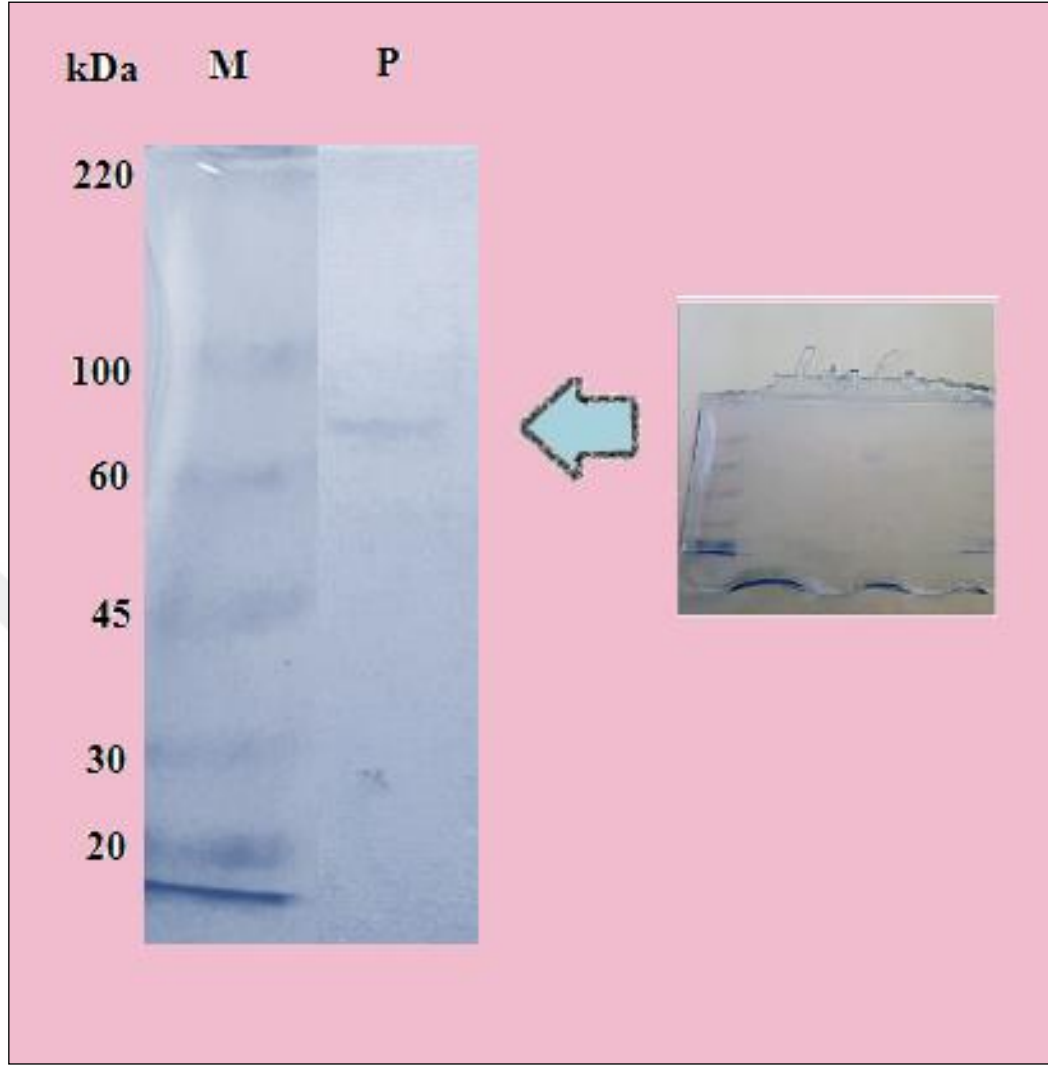
4.2. SDS-PAGE ile Enzim Saflık Kontrolü ve Molekül Ağırlığı Tayini

Afinite kolonundan elüe edilen çilek proteazının saflığı SDS-PAGE metodu kullanılarak kontrol edilmiştir. Enzimin molekül ağırlığı aynı jelle yüklenen standart protein belirteçlerinin molekül ağırlıkları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Boyandıktan sonra jelde afinite kolon elüatının yüklendiği kısımda tek bir protein bandı gözlenmiştir ve buradan enzimin monomerik karaktere sahip bir proteaz olduğu ve başarılı bir şekilde saflaştırıldığı sonucuna varılmıştır. Çilek proteazının molekül ağırlığı 65,8 kDa olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4.ve Şekil 4.5.).

Literatürde çilek proteazına yakın moleküler ağırlığa sahip bazı serin proteazlar bildirilmiştir [77, 78]. Bunun yanında, daha büyük moleküler ağırlığa sahip olan serin proteaz kaynakları (*Mytella charruana*: 83,1 kDa; karanlık kaynaklı yaşlanan buğday yaprakları: 98,9 kDa) da bulunmaktadır [79, 80].



Şekil 4.4. SDS-PAGE sonucunda elde edilen jel



Şekil 4.5. SDS-PAGE ile çilek proteazının saflık kontrolü ve molekül ağırlığı tayini. M: Marker standart proteinleri (20-220 kDa), P: Proteaz enzimini içeren elüat (saflaştırılmış proteaz enzimi).

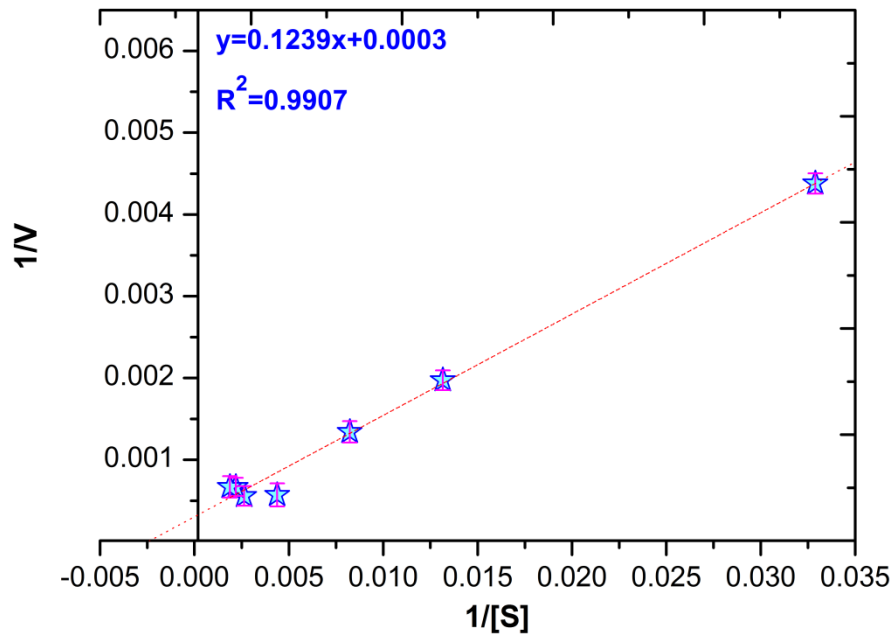
4.3. Saflaştırılan Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

4.3.1. Saflaştırılan proteaz enziminin BSA hidrolizine ait kinetik parametreler

Saf proteaz enzimiyle gerçekleştirilen denemede; BSA hidrolizinin kinetik parametrelerini (K_m ve V_{max}) belirlemek amacıyla Lineweaver-Burk diyagramı oluşturulmuştur. Bu amaçla 0,0304 ve 0,532 mM konsantrasyon aralığında substrat çözeltileri kullanılarak standart koşullar altında başlangıç hızı değerleri ölçülmüştür. Ölçülen başlangıç hızlarının resiprokal değerlerine ($1/V$) karşı başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerinin ($1/[S]$) işaretlenmesiyle Lineweaver-

Burk diyagramı elde edilmiştir. Oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramı Şekil 4.6.'da verilmiştir.

Oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramından proteaz enziminin 40 °C ve pH 6'daki BSA hidrolizinin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,4 mM ve 3333,3 μmol tirozin $\text{mL}^{-1} \text{dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Ferreira ve ark. tarafından gerçekleştirilen başka bir kinetik çalışmada, karakterize ettikleri bromelin enziminin BSA substratı için 330,4 mg L^{-1} 'lık (5×10^{-3} mM) bir K_m değerine ve 2,5 $\text{mg BSA L}^{-1} \text{dk}^{-1}$ 'lık V_{max} değerine sahip olduğu bildirilmiştir [81].



Şekil 4.6. Saf çilek proteazının BSA substratına ait Lineweaver-Burk grafiği

4.3.2. Saflaştırılan proteaz enziminin protein substratlara karşı spesifiklik sonuçları

Çilek meyvesinden saflaştırılan proteaz enziminin kazein, azokazein, BSA, jelatin ve hemoglobin protein substratları varlığındaki aktivitesi tayin edilmiştir. Enzim denenen tüm substratlarla reaksiyon vermiştir. Enzimin maksimum aktiviteyi hemoglobin substratı varlığında verdiği görülmüştür. Denenen substratlar içerisinde

enzimin en az ilgi duyduğu substrat ise kazein (%59,3) olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Saf çilek proteazının protein substratlara karşı substrat spesifikliğı sonuçları

Substrat	Bağıl aktivite (%)*
Hemoglobin	100
Azokazein	84,6 ± 0,65
BSA	76,1 ± 0,42
Jelatin	63,8 ± 0,91
Kazein	59,3 ± 1,01

*± değerler üçlü ölçümlerin standart sapma değerini ifade etmektedir.

Bir başka çalışmada, *Abrus precitorius* yapraklarından saflaştırılan serin proteaz, protein substratlara karşı spesifiklik açısından test edilmiştir. Spesifikliğı belirlemek amacıyla azokazein modifiye substratı hariç diğer tüm doğal protein substratlar bu çalışmada da test edilmiştir. *Abrus precitorius* serin proteazı test edilen tüm doğal substratlarla aktivite göstermiştir, ancak spesifiklik sonuçlarına bakıldığında çilek proteazının neredeyse tam zıttı kabul edilebilecek bulguların elde edildiğı görülmektedir (jelatin hariç) [82]. *Bacillus* sp. EMB9 'dan izole edilen bir halofilik proteaz, kazein hariç olmak üzere benzer protein substrat spesifikliğı sonuçlarını göstermiştir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmanın sonuçlarından farklı olarak, en yüksek proteaz aktivitesinin kazein ile elde edildiğı bildirilmiştir [21].

4.3.3. Saflaştırılan proteaz enziminin p-nitroanilid konjuge sentetik substratlara karşı spesifiklik sonuçları

Çilek proteaz enziminin substrat spesifikliğini belirlemek amacı ile p-nitroanilid ile konjuge edilmiş sentetik peptid substratları reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde kullanılmıştır. Çilek proteaz enziminin p-NA konjuge sentetik substratlara karşı spesifiklik sonuçları Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Saf çilek proteazının oligopeptidil-p-NA konjuge sentetik substratlarına karşı spesifikliği

Substrat	Bağıl aktivite (%) [*]
N-Suc-L-Phe-pNA	100
Nα-Benzoil-DL-Arg-pNA	82,0 $\pm$ 0,33
N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	61,5 $\pm$ 0,87
L-Leu-pNA	58,7 $\pm$ 0,51

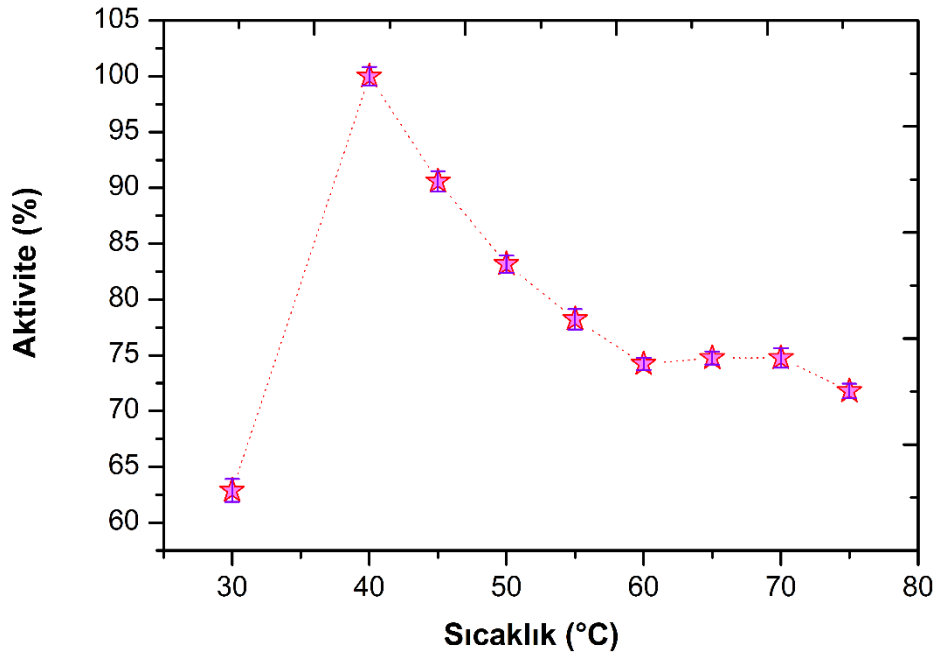
^{*} $\pm$ değerler üçlü ölçümlerin standart sapma değerini ifade etmektedir.

Çilek proteazı denenen tüm sentetik substratlarla reaksiyon vermiştir. Substratlar arasında en yüksek spesifiklik N-Suc-L-Phe-pNA, ardından N α -Benzoil-DL-Arg-pNA (DL-BAPNA) substratına karşı gözlenmiştir (Tablo 4.3.). Karakterizasyonu yapılan çilek proteaz enziminin N-Suc-L-Phe-pNA ve N α -Benzoil-DL-Arg-pNA (DL-BAPNA) substratları ile daha yüksek aktivite göstermesi sırasıyla Phe- ve Arg-kalıntılarını hidroliz için yüksek spesifiklikle tercih ettiğini göstermektedir.

Singh ve ark., bir serin proteazı olan Crinumin'in benzer şekilde N-Suc-L-Phe-pNA ve L-Leu-pNA'ya karşı aktivite gösterdiğini, ancak N α -Benzoil-DL-Arg-pNA ve N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA'ya karşı aktivite göstermediğini bildirmiştir. [78]. Çilek proteazı Crinumin'den daha geniş substrat spesifiliği sergilemiştir. Başka bir serin proteazı olan Wrightin, çilek proteazının aksine, N-Suc-L-Phe-pNA, N α -Benzoil-DL-Arg-pNA ve L-Leu-pNA substratlarına karşı amidolitik aktivite göstermemiştir, hidroliz için sadece -Ala rezidülerini tercih etmiştir [83].

4.3.4. Saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları

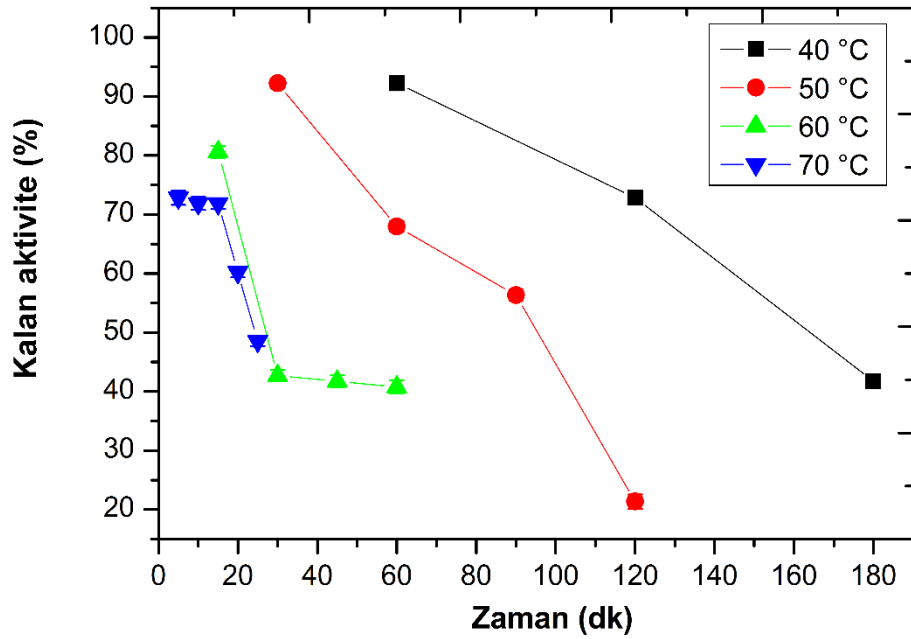
Proteaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın tayini için 30-75 °C arasındaki sıcaklıklar denenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre enzim test edilen tüm sıcaklıklarda aktivite göstermiştir ve maksimum aktivite 40 °C'de elde edilmiştir (Şekil 4.7.). Literatürde 40 °C sıcaklıkta optimum aktivite gösteren başka serin proteaz enzimleri de bildirilmiştir [14, 15, 79, 82, 84].



Şekil 4.7. Saf çilek proteazının BSA substratına ait optimum sıcaklık grafiği

4.3.5. Saflaştırılan proteaz enziminin termal kararlılık sonuçları

Saf proteazın termal kararlılığını belirlemek amacıyla enzim 40-70 °C arasındaki sıcaklıklarda bölüm 3.3.1.10.'da bahsedildiği şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Termal kararlılık sonuçları Şekil 4.8.'deki grafikte verilmiştir. Enzimin 40 °C'de 1 saat inkübasyonu neticesinde aktivitesini neredeyse hiç kaybetmediği, 2 saat inkübasyonu neticesinde aktivitesinde az miktarda azalma olduğu, 3 saat inkübasyonu neticesinde ise aktivitesinin yarıya indiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, enzimin 50 °C'de 30 dk sonunda aktivitesini neredeyse tamamen koruduğu, 120 dk sonunda %79'unu kaybettiği görülmüştür. 60 °C'de ise 15. dk'nın sonunda enzim aktivitesinin %20'lik bir kısmını kaybederken, daha uzun inkübasyon süresinde enzimin aktivitesinin yarısından fazlasını kaybettiği tespit edilmiştir. Son olarak 70 °C gibi yüksek bir sıcaklık değerinde 15. dk'nın sonuna kadar enzimin aktivitesinin %70'ini koruması, 30 dk sonunda ise halen aktivitesinin %48'ini koruması önemli bir bulgudur.



Şekil 4.8. Saf çilek proteazının termal kararlılık grafiği

Hemici ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada elde edilen termal kararlılık sonuçlarına göre, 50 ve 60 °C'lik sıcaklık değerlerinde çilek proteazının *Fasciola hepatica*'dan saflaştırılan sistein proteazından çok daha kararlı olduğu görülmektedir [85]. Bunun yanında, 40 °C'de *Aeribacillus pallidus* C10 serin proteazının termal kararlılık sonuçları, aynı sıcaklıkta çilek proteazının kararlılık sonuçları ile benzer bulunmuştur. Fakat daha yüksek sıcaklık değerlerinde *Aeribacillus pallidus* C10 serin proteazının kararlılığı daha yüksektir [76].

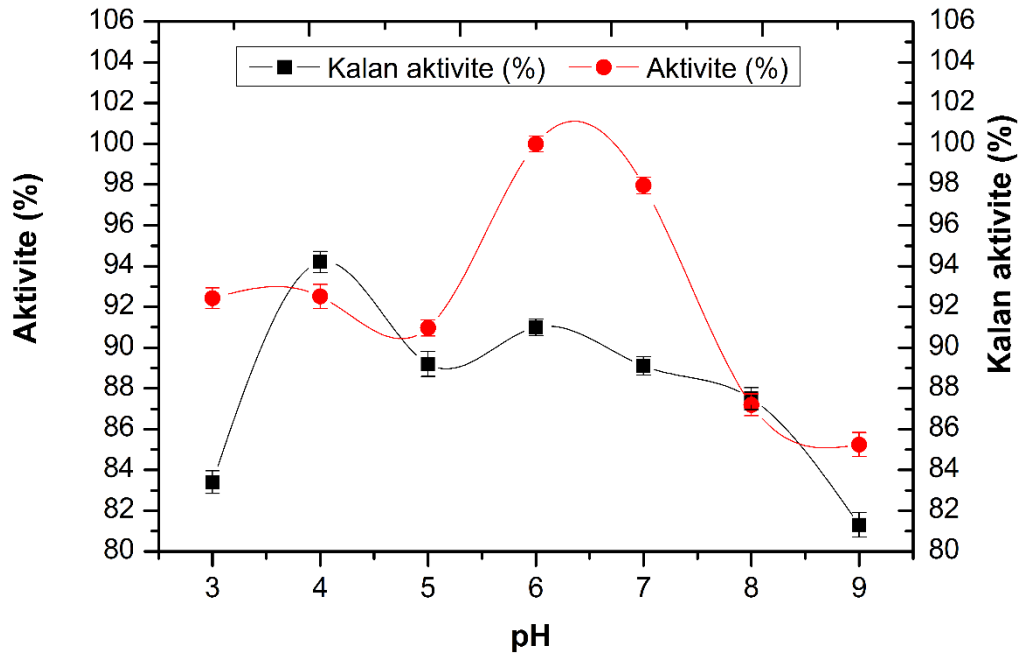
4.3.6. Saflaştırılan proteaz enziminin pH profili

Çilek proteaz aktivitesi üzerine pH etkisi, pH 3-9 aralığında belirlenmiştir. Enzim, test edilen pH değerlerinin hepsinde aktivite göstermiştir, oldukça geniş bir pH aralığında aktiftir. En yüksek aktiviteyi pH 6'da (%100) ve en düşük aktiviteyi pH 9'da (%85,25) göstermiştir. Ayrıca pH 7'deki enzim aktivitesi (%98) pH 6'dakine oldukça yakın bulunmuştur (Şekil 4.9.). Literatürde hafif asidik veya nötral optimum pH değerlerine sahip başka proteaz enzimleri de mevcuttur [10-12, 22]. Çilek proteazından farklı olarak, karanlık kaynaklı yaşanan buğday proteazının aktivitesi

pH 4 ve daha düşük pH değerlerinde ve pH 8 ve daha yüksek pH değerlerinde belirgin bir şekilde azalmıştır [80].

Saflaştırılmış enzimin kararlılık çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre, pH 3-9 arasındaki tamponlarla enzim 3 saat inkübe edildiğinde tüm pH değerlerinde aktivitesinin büyük kısmını koruduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9.). İnkübasyon süresi sonunda kontrole kıyasla en fazla aktivite kaybı pH 9'da %18,7 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre geniş bir pH aralığında çilek proteazının kararlılığı oldukça yüksektir.

Çilek proteazı, pH kararlılığı açısından *Phanerochaete chrysosporium* aspartik peptidazı, *Mytella charruana* serin proteazı ve *Aeribacillus pallidus* C10 serin proteazı ile benzer sonuçlar vermiştir [76, 79, 86]. Çilek proteazının pH kararlılığı, *Abrus precitorius* serin proteazından çok daha yüksek bulunmuştur [82].

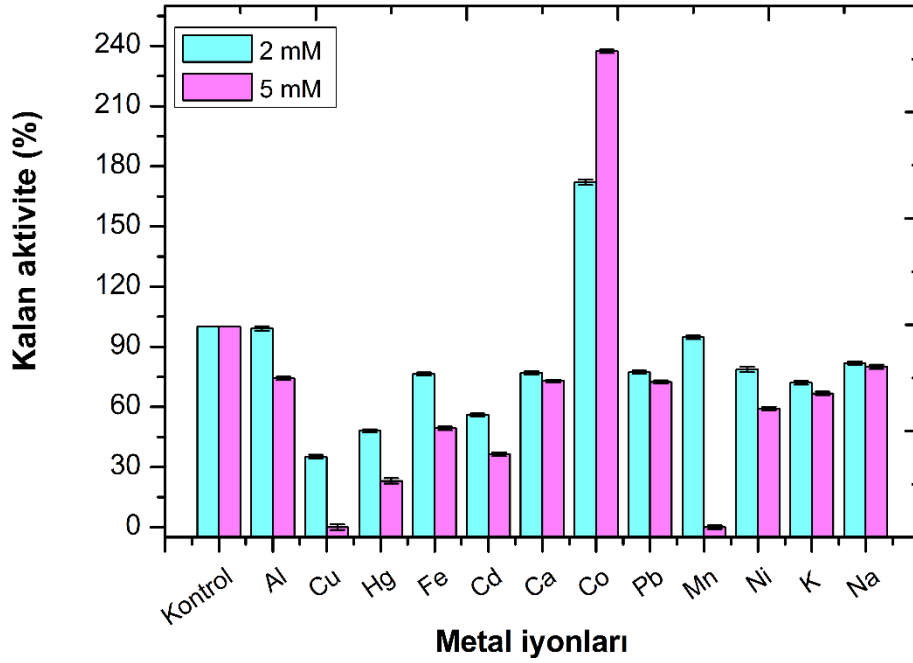


Şekil 4.9. Saf çilek proteazının optimum pH ve pH kararlılığı grafiği

4.3.7. Saflaştırılan proteaz enzimine bazı metal iyonlarının etkisi

Bu denemede saf proteaz enziminin aktivitesine metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. Test edilen metal iyonları ve aktiviteye etkileri Şekil 4.10.'daki grafikte verilmiştir. Sonuçlara göre; denenen tüm metal iyonları arasında Co^{2+} enzim aktivitesini arttırırken, diğer tüm metaller enzim aktivitesini azaltmıştır. Co^{2+} 2 mM düzeyinde kullanıldığında enzim aktivitesini %172, 5 mM düzeyinde kullanıldığında ise %237 arttırdığından; Co^{2+} 'ın çilek proteaz enzimini şiddetle aktive ettiği söylenebilir. Bununla beraber Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının çilek proteaz enzimini şiddetle inhibe ettiği görülmüştür. Özellikle Cu^{2+} ve Mn^{2+} iyonları 5 mM düzeyinde enzimi tamamen inhibe etmiştir. Toksik ağır metaller olan Hg^{2+} ve Cd^{2+} da enzim aktivitesini sırasıyla %23 ve %36'ya kadar azaltmıştır. Test edilen tek değerlikli metal iyonlarından K^{+} enzim aktivitesini %67 civarlarına azaltırken, Na^{+} başlangıç aktivitesinin %80'ine düşürmüştür. Yine, test edilen +3 değerlikli metal iyonlarından Al^{3+} aktiviteyi %74'e, Fe^{3+} ise %49'a azaltmıştır.

Çilek proteazı aktivitesine metal etkisi sonuçlarına benzer şekilde, Cu^{2+} iyonları *Micrococcus* sp.'den saflaştırılan alkali proteaz üzerinde önemli bir inhibisyon etkisi yaratmıştır. Ayrıca, Ca^{2+} ve Ni^{2+} iyonları ile elde edilen sonuçlar da çilek proteazı ile benzerlik göstermektedir. Bunun yanında, Mn^{2+} iyonları çilek proteazından farklı olarak *Micrococcus* sp. proteazının aktivitesinde artışa neden olmuştur [87]. Suwannaphan ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmanın sonuçlarına göre; Cd^{2+} , Cu^{2+} ve Mn^{2+} iyonları *Bacillus* sp.'den saflaştırılan serin proteazını kuvvetli bir şekilde inhibe etmiştir. Çilek proteazını şiddetle aktive eden Co^{2+} iyonları da bu enzimin aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır [88]. Yadav ve ark.'nın *Aspergillus flavus* MTCC 9952'den saflaştırdıkları serin proteaz enzimi Cu^{2+} ve Hg^{2+} iyonları tarafından tamamen inhibe edilirken, çilek proteazının aksine Ca^{2+} ve Ni^{2+} iyonları tarafından aktive edilmiştir [89]. Cu^{2+} ve Hg^{2+} iyonları *Bacillus* sp.'den saflaştırılan serin proteaz üzerinde çilek proteazı ile benzer etkiler göstermiştir, ancak Co^{2+} iyonları enzimi güçlü bir şekilde inhibe etmiştir [90].



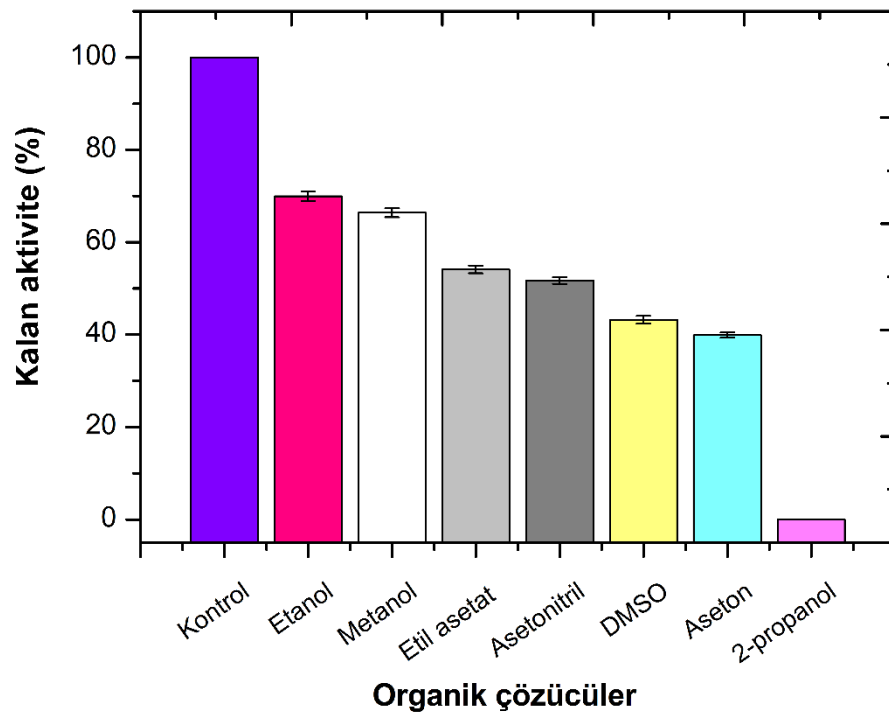
Şekil 4.10. Saf çilek proteazı aktivitesine metal iyonlarının etkisi

4.3.8. Saflaştırılan proteaz enzimine bazı organik çözücülerin etkisi

Bu çalışmada, çeşitli organik çözücülerle inkübe edildiğinde çilek proteaz enziminin aktivitesini ne ölçüde koruyabildiği incelenmiştir. Çalışmada test edilen tüm çözücülerin enzim aktivitesini düşürdüğü saptanmıştır. Denenen çözücüler içerisinde enzimin en dayanıklı olduğu çözücüler etanol ve metanoldür. Etanol ve metanol gibi bir alkol olan 2-propanol ise enzimi tamamen inhibe etmiştir. Etil asetat, asetonitril, aseton ve DMSO çözücülerini ile aktivite ölçümleri birbirlerine benzer sonuçlar vermiştir. Sonuçlara göre çilek proteazının organik çözücüler varlığında kararlılığının ortalama düzeyde olduğu söylenebilir (Şekil 4.11.).

DMSO varlığında *Aspergillus oryzae* CH93'ten saflaştırılan alkali proteazın kararlılık sonuçları çilek proteazı ile benzerlik göstermektedir. 2-propanol varlığında ise bu enzimin kararlılığı çilek proteazından daha yüksek bulunmuştur [91]. Enling ve ark. tarafından *Micrococcus* sp.'den saflaştırılan alkali proteaz, 2-propanol varlığında çilek proteazına benzer sonuçlar vermiştir. Enzimin DMSO varlığındaki kararlılığının çilek proteazından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte,

çilek proteazı *Micrococcus* sp. alkali proteazına kıyasla etanol ve metanol varlığında kararlılığını daha iyi koruyabilmiştir [87]. Test edilen organik çözücülerin varlığında, bir başka serin proteazı olan *Aeribacillus pallidus* C10 proteazının kararlılığının, genel olarak çilek proteazından daha yüksek olduğu belirlenmiştir [76]. Wang ve ark.'nın gerçekleştirdikleri çalışmanın sonuçlarına göre, karanlık kaynaklı yaşlanmış buğday yapraklarından saflaştırılan serin proteazı etanol ve DMSO varlığında kararlılığını korurken, metanol varlığında enzim aktivitesinde önemli bir azalma meydana gelmiştir [80].



Şekil 4.11. Saf çilek proteazı aktivitesine organik çözücülerin etkisi

4.3.9. Saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı spesifik inhibitörlerin etkileri

Serin proteaz inhibitörleri TPCK, TLCK ve PMSF; aspartik proteaz inhibitörü Pepstatin A; sistein proteaz inhibitörü IAA ve metaloproteaz inhibitörleri EDTA ve 1,10-fenantrolin aktif bölge yönelimli geri dönüşümsüz inhibitörlerinin çilek proteazı üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.4.'de kalan enzim aktivitesi (%) olarak verilmiştir. Test edilen inhibitörlerin yarattığı

inhibisyon etkileri karşılaştırıldığında, serin proteaz inhibitörlerinin çilek proteazını kuvvetle inhibe ettiği görülmektedir. Hatta TPCK 3 mM düzeyinde kullanıldığında enzimi tamamen inhibe etmiştir. Pepstatin A'nın 1 mM düzeyinde enzim aktivitesini az da olsa arttırdığı, 5 mM düzeyinde ise göz ardı edilebilir bir inhibisyon etkisine neden olduğu görülmüştür. Metaloproteaz inhibitörleri, 1 mM'lık konsantrasyonda enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi yaratmazken, 5 mM konsantrasyon seviyesine çıkıldığında proteaz aktivitesinin yarıya indiği belirlenmiştir. IAA, çilek proteazı üzerinde hem 1 hem de 5 mM'da önemli bir inhibisyon etkisine sahiptir. Bu sonuçlar, çilek proteazının bir serin proteaz olabileceğini ve de genel olarak aktif bölge yönelimli geri dönüşümsüz inhibitörlerin varlığından etkilendiğini göstermektedir.

Tablo 4.4. Saf çilek proteazının aktivitesine aktif bölge yönelimli inhibitörlerin geri dönüşümsüz inhibisyon etkisi

İnhibitör	Konsantrasyon (mM)	Kalan aktivite (%)*
Kontrol	0	100
PMSF	1	83,5 ± 0,77
PMSF	5	30,7 ± 0,45
TPCK	1	10,5 ± 0,59
TPCK	3	0
TLCK	1	101,1 ± 1,22
TLCK	3	24,7 ± 0,88
EDTA	1	101,2 ± 1,04
EDTA	5	50,8 ± 0,95
1,10-FENANTROLİN	1	124,9 ± 0,56
1,10- FENANTROLİN	5	48,0 ± 0,73
İAA	1	66,8 ± 0,23
İAA	5	54,5 ± 0,39
PEPSTATİN A	1	124,1 ± 0,95
PEPSTATİN A	5	95,9 ± 0,87

*± değerler üçlü ölçümlerin standart sapma değerini ifade etmektedir.

Benzer şekilde, *Bacillus* sp. serin proteazı hem PMSF hem de EDTA tarafından kuvvetle inhibe edilirken, 1,10-fenantrolinin inhibisyon etkisinin daha düşük olduğu gözlenmektedir [88]. Ek olarak, Wang ve ark.'nın karanlık kaynaklı yaşlanmış buğday yapraklarından saflaştırdığı serin proteaz, PMSF ve EGTA tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir [80]. Ayrıca, Enling ve ark.'nın bildirdiklerine göre, *Micrococcus* sp. alkali proteazı da hem serin hem de metaloproteaz inhibitörlerinin varlığından büyük ölçüde etkilenmiştir. Alkali proteaz enzimi serin proteaz olarak tanımlansa da, sonuçlara göre EDTA, PMSF'den daha yüksek inhibisyon etkisi göstermiştir [87].

4.4. Çilek Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu

4.4.1. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu

4.4.1.1. Aljinat konsantrasyonunun optimizasyonu

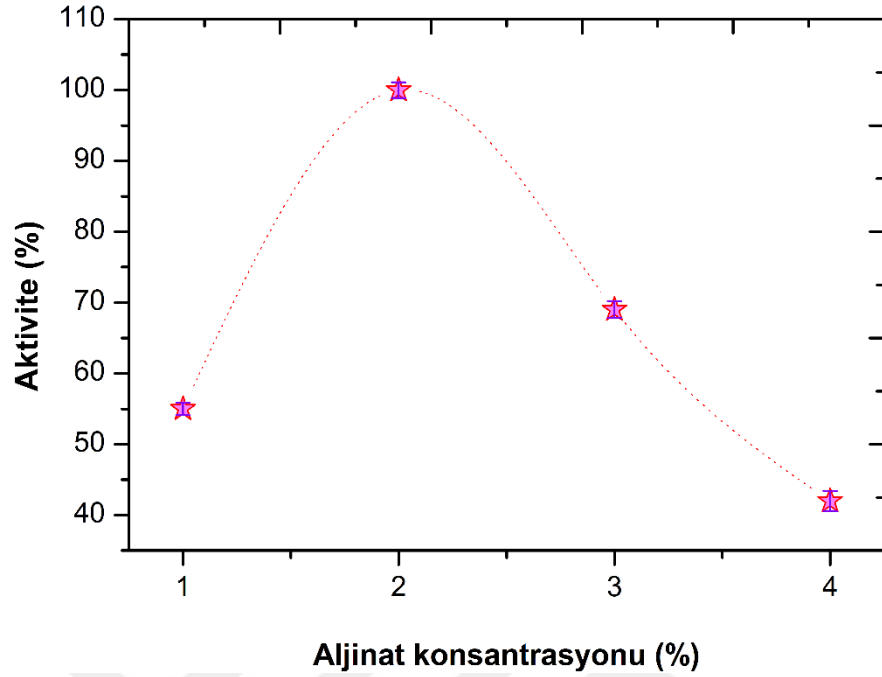
Daha kararlı kürecikler elde etmek amacıyla, küreciklerin hazırlanma aşamasında farklı Na-aljinat konsantrasyonları denenmiştir. Çilek proteaz enziminin Ca-aljinat jelde immobilizasyonunda optimum aljinat konsantrasyonunun belirlenmesi için; %1, %2, %3 ve %4'lük (a/h) konsantrasyonlarda hazırlanan Na-aljinat çözeltileriyle immobilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12.'de verilmiştir.

İmmobilize enzimlerin spesifik aktivite sonuçları değerlendirildiğinde; en yüksek enzim aktivitesi %2'lik aljinat konsantrasyonunda gözlenmiştir. Bu yüzden bu aşamadan sonra gerçekleştirilecek immobilizasyon işlemlerinde aljinat konsantrasyonunun %2'de sabit tutulmasına karar verilmiştir.

Küreciklerin gözenek boyutu, substrat ve ürünün, mikro ortamında enzimi tutan aljinat jel matriksinin içine ve dışına kolayca diffüzlenebileceği genişlikte olmalıdır. Na-aljinat çözeltisinin konsantrasyonu ne kadar düşükse, küreciklerin gözenek boyutu o kadar büyük olacaktır ki bu da enzimin küreciklerden daha fazla sızmasına

neden olacaktır. Benzer şekilde, Na-aljinatın konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa, küreciklerin gözenek boyutu o kadar küçük olur ve bu durum immobilizasyon veriminin düşmesine neden olur [92]. Oluşturulan küreciklerden enzimin dışarıya sızması, daha büyük gözenek boyutu nedeniyle %1'lik Na-aljinat konsantrasyonunda daha fazla gözlenmiştir. Tutuklanmış enzimin aktivitesi %3 ve %4'lük Na-aljinat konsantrasyonunda nispeten daha düşük bulunmuştur. Bu durum, gözenek boyutunun daha küçük olmasına neden olan ve böylece substratın enzimin bulunduğu iç bölgeye nüfuz etmesini engelleyen yüksek kürecik viskozitesine bağlı olabilir. Keratinaz, lipaz ve proteazlar gibi çeşitli enzimlerin immobilizasyonu için %2-3 oranındaki Na-aljinat konsantrasyonunun daha uygun olduğunu bildiren farklı araştırmaların sonuçları literatürde mevcuttur [93-95].

Çilek proteazına benzer şekilde, Ca-aljinat küreciklerde tutuklanarak immobilize edilmiş *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS proteazı için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında %1, %2, %3 ve %4'lük (a/h) Na-aljinat konsantrasyonları denenmiştir. Aljinat konsantrasyonunun optimizasyon sonuçları genel anlamda benzerlik göstermekle birlikte, *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS proteazı için de optimum aljinat konsantrasyonu %2 (a/h) olarak bulunmuştur [96]. Oğlak beyninden saflaştırılmış dipeptidilpeptidaz IV (DPP IV) enziminin Ca-aljinat küreciklerde immobilizasyonunda ise; %2 aljinat konsantrasyonunda enzimin gözeneklerden dışarıya kaçışı fazla iken, %2,5 aljinat konsantrasyonunda tutuklanmış enzim için optimum aktiviteye ulaşılmıştır [97].



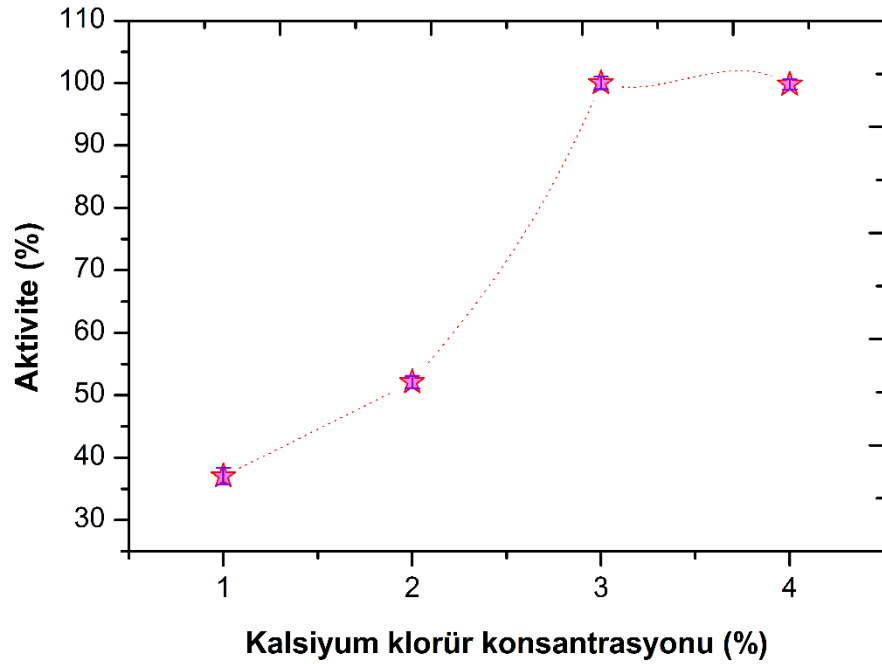
Şekil 4.12. İmmobilize çilek proteaz enziminin aktivitesine aljinat konsantrasyonunun etkisi

4.4.1.2. CaCl₂ konsantrasyonunun optimizasyonu

Çilek proteaz enziminin Ca-aljinat jelde immobilizasyonunda optimum CaCl₂ konsantrasyonunun belirlenmesi için; %1, %2, %3 ve %4 'lük (a/h) konsantrasyonlarda hazırlanan CaCl₂ çözeltilerinde immobilizasyon işlemleri deneysel kısımda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.13.'de verilmiştir.

Spesifik aktivite değerleri kıyaslandığında en yüksek spesifik aktivite değeri %3'lük CaCl₂ çözeltisi kullanıldığında elde edilmiş, bunun yanında %4'lük CaCl₂ çözeltisinin sonucu da %3'lük olanla neredeyse aynı çıkmıştır. İmmobilize enzimler arasında en yüksek spesifik aktivite değeri %3'lük CaCl₂ çözeltisi kullanıldığında elde edildiğinden bu aşamadan sonra gerçekleştirilecek immobilizasyon işlemlerinde %3'lük CaCl₂ çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Bacillus subtilis KIBGE-HAS proteazının Ca-aljinat küreciklerde immobilizasyonunda 0,2 M (%2,22, a/h) CaCl_2 kullanıldığında en iyi sonuç alınmıştır, bu değerin altında ve üzerinde immobilizasyon etkinliği azalmıştır [96]. Oğlak dipeptidilpeptidaz IV enziminin Ca-aljinat küreciklerde immobilizasyonunda ise %1'lik CaCl_2 çözeltisi kullanıldığında optimum aktiviteye ulaşılrken, bu değerin üzerine çıkıldıkça tutuklanmış enzimin aktivitesi giderek azalmıştır [97].



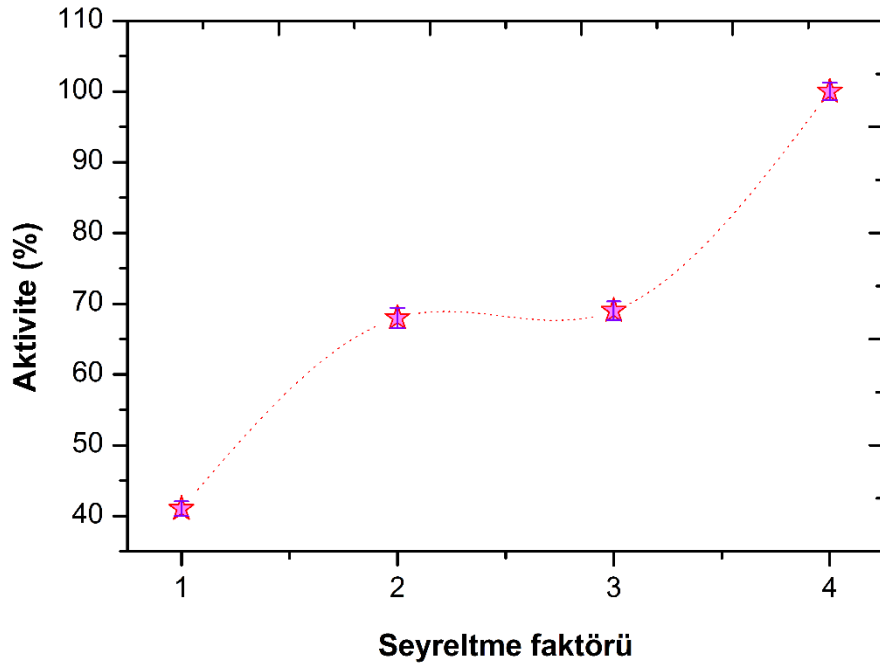
Şekil 4.13. İmmobilize çilek proteaz enziminin aktivitesine kalsiyum klorür konsantrasyonunun etkisi

4.4.1.3. Enzim miktarı optimizasyonu

İmmobilizasyon işleminde enzim çözeltisi olarak ya ham ekstrakt (SF=1; 22 mg/mL) doğrudan kullanılmış ya da pH 6 fosfat tamponu ile çeşitli seyrelmeler yapılmıştır. Bu amaçla, 1/2 oranında seyreltilmiş ham ekstrakt (SF=2; 15 mg/mL), 1/3 oranında seyreltilmiş ham ekstrakt (SF=3; 12 mg/mL) ve 1/4 oranında seyreltilmiş ham ekstrakt (SF=4; 10 mg/mL) olmak üzere dört farklı enzim çözeltisi hazırlanmış ve immobilizasyon etkinliğine etkisi spesifik aktivite değerleri hesaplanarak incelenmiştir.

Bu enzim çözeltisi seyrelme oranları kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyon işlemlerinde elde edilen küreciklerin spesifik aktivite değerleri karşılaştırıldığında; en uygun seyreltme faktörünün 4 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.14.). Bundan sonraki çalışmalarda enzim çözeltisi olarak dört kat seyreltilmiş ham ekstrakt (SF=4) kullanılmıştır.

Bir sistein proteazı olan Araujiain, Ca-aljinat küreciklerde tutuklanarak immobilize edilmiştir. Immobilizasyon koşullarının optimizasyonu aşamasında, farklı miktarlarda enzim (0,5-25 mg) küreciklerde immobilize edilerek aktivitenin nasıl değiştiği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; 10 mg'a kadar enzim aktivitesi oldukça düşük düzeyde kalırken, 10-25 mg civarında enzim aktivitesinde büyük ölçüde artış meydana gelmiştir [98].



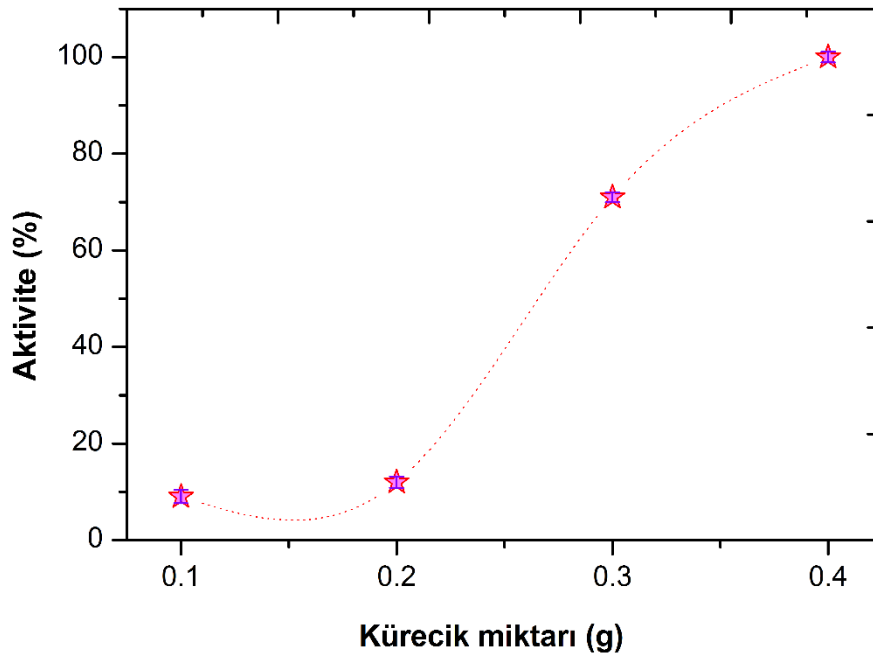
Şekil 4.14. Immobilize çilek proteaz enziminin aktivitesine enzim çözeltisi seyrelme oranının etkisi

4.4.1.4. Kürecik miktarı optimizasyonu

İmmobilizasyonda kullanılan bileşenlerin optimum konsantrasyonlarının belirlenmesinin ardından bu konsantrasyonlar kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyon işleminden elde edilen immobilize enzim kürecikleri farklı

miktarlarda reaksiyon ortamında kullanılmış ve reaksiyon sonunda hesaplanan spesifik aktivite sonuçları kıyaslanmıştır. Reaksiyon ortamının sıvı hacmi sabit tutularak; immobilize kürecik sayısı 0,1 g (3 kürecik); 0,2 g (5 kürecik); 0,3 g (8 kürecik) ve 0,4 g (11 kürecik) olacak şekilde değiştirilerek enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, immobilize kürecik miktarı arttıkça enzimin spesifik aktivitesinin de artış gösterdiği görülmektedir. Buna göre en iyi sonuç 0,4 g immobilize kürecik kullanıldığında elde edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.15.'de verilmiştir.

Bir deniz bakterisi olan *Teredinobacter turnirae* hücreleri Ca-aljinat küreciklerde immobilize edilmiş ve alkali proteaz üretimi amacıyla kullanılmıştır. Immobilizasyon koşulları optimize edilirken kullanılan immobilize kürecik miktarı da değiştirilerek optimum düzeye getirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla reaksiyon ortamında 10-300 arasında değişen sayıda kürecik kullanılarak enzim aktivitesi belirlenmiştir. Toplam 200 küreciğe kadar, kürecik sayısı arttıkça enzim aktivitesi de belirgin şekilde artmıştır. Bu kürecik sayısının üzerinde ise enzim aktivitesinde önemli bir artış gözlenmemiştir. Bu sebeple çalışmanın geri kalanında 200 immobilize kürecik kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir [95].



Şekil 4.15. İmmobilize çilek proteaz enziminin aktivitesine kürecik miktarının etkisi

Özetle, çilek proteaz enziminin Ca-aljinat jelde tutuklanmasının optimizasyon sonuçları Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.5. Çilek proteaz enziminin Ca-aljinat jelde tutuklanmasının optimizasyon sonuçları

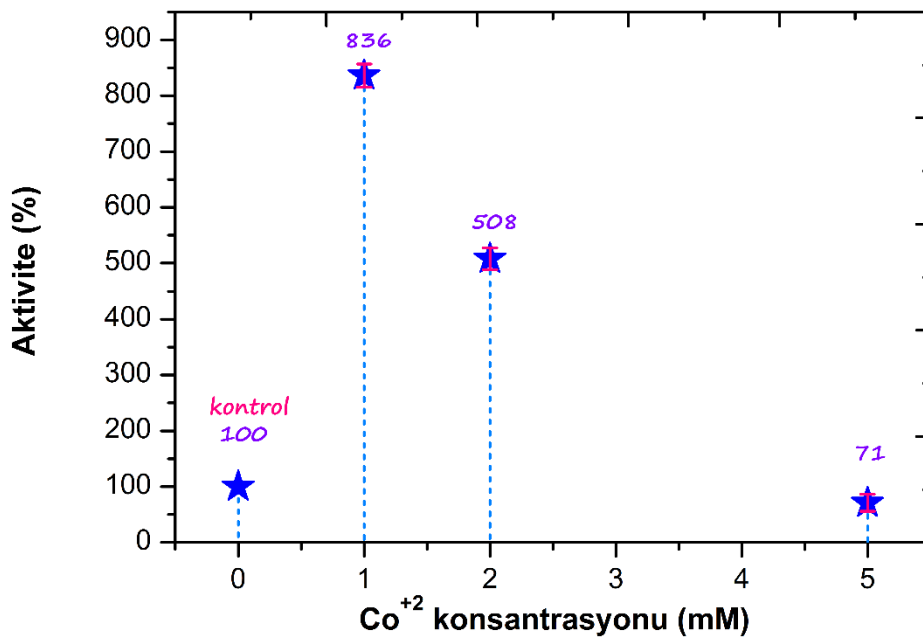
Parametre	Optimum değer
Aljinat Konsantrasyonu (%)	2
CaCl ₂ Konsantrasyonu (%)	3
Enzim Çözeltisi Seyrelme Faktörü	4
Kürecik Miktarı (g)	0,4

4.4.2. Co²⁺ İyonlarının immobilizasyon üzerine etkisinin incelenmesi

Optimum koşullarda gerçekleştirilen proteaz enziminin immobilizasyonu esnasında ortama Co²⁺ iyonları eklenmiş ve Co²⁺ iyonları da enzimle beraber oluşan küreciklerde immobilize edilmiştir. Co²⁺ iyonlarının seçilmesinin nedeni; daha önce gerçekleştirilen ‘metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi’ tayininin sonuçlarına göre, çilek proteaz enzimi için kuvvetli bir aktivatör özelliği göstermesidir. Bu çalışmada da enzimle beraber immobilize edilen Co²⁺ iyonlarının immobilize enzimin etkinliğini arttırması hedeflenmiştir. Literatürde proteaz enzimini kuvvetle aktive eden metal iyonları ile ilgili başka çalışmalar da mevcuttur. Örneğin domuz spermelerindeki akrosin adı verilen proteaz enziminin in-vitro proteolitik aktivitesinin bir dizi monovalent ve divalent metal iyonları ile stimüle edildiği bildirilmiştir. Monovalent katyonların eşdeğer konsantrasyonları proteolitik aktiviteyi 2-3 kat arttırırken, iki değerlikli metal iyonları proteolitik aktivitede 24 (magnezyum) ve 46 (kalsiyum) kat artışa neden olmuştur [99].

Farklı konsantrasyonlarda (1, 2 ve 5 mM) Co²⁺ içeren immobilize enzimlerin aktiviteleri, Co²⁺ içermeyen immobilize enzimin aktivitesi ile kıyaslanmış ve sonuçlar Şekil 4.16.’da verilmiştir. Spesifik aktivite değerlerine bakıldığında enzimle beraber immobilize edilen Co²⁺ iyonlarının enzim etkinliğini önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır. En yüksek etki, Co²⁺ iyonları 1 mM düzeyinde kullanıldığında

gözlenmiştir. Co^{2+} iyonları 1 ve 2 mM düzeyinde kullanıldığında enzim aktivitesi kontrole kıyasla büyük bir artış gösterirken, 5 mM düzeyinde kullanıldığında aktivitede azalma meydana gelmiştir. Bu durum enzimi çevreleyen kürecikler içerisindeki alanın fazla miktarda Co^{2+} iyonları ile dolması ve bunun sonucunda substrat ve ürün difüzyonunun zorlaşmasından kaynaklanıyor olabilir. Deney sonucunda enzim aktivitesinde kontrole kıyasla; 1 mM Co^{2+} düzeyinde 8,4 kat artış ve 2 mM Co^{2+} düzeyinde 5,1 kat artış gözlenirken, 5 mM Co^{2+} düzeyinde ise aktivitede %29'luk bir azalma meydana gelmiştir.



Şekil 4.16. Enzimle beraber immobilize edilen Co^{2+} iyonlarının immobilize çilek proteaz enziminin aktivitesine etkisi

4.4.3. İmmobilizasyon işleminin başarısının değerlendirilmesi

Jel küreciklerinde, jelleşmeyi sağlayan etmenin aljinat ve Ca^{2+} iyonları arasındaki çapraz bağlanma olması nedeniyle Na-aljinat ve CaCl_2 konsantrasyonu enzim tutuklanması için kritik parametrelerdir. Dolayısıyla, maksimum immobilizasyon verimini elde etmek için çeşitli Na-aljinat ve CaCl_2 konsantrasyonları denenmiştir. Tablo 4.5.'den görülebileceği gibi en yüksek immobilizasyon aktivite verimi %2 (a/h) aljinat konsantrasyonu ve % 3 (a/h) CaCl_2 konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bu yüzden çilek proteazı immobilize edilirken kürecik oluşumunda bu iki sabit

konsantrasyonda çalışılmıştır. “İmmobilizasyon verimi” hesaplanırken aktiviteye göre ve yüklenen protein miktarına göre olmak üzere iki farklı hesaplama yapılmaktadır [74]. Çilek proteazı için her iki verim de hesaplanıp Tablo 4.6.’da verilmiştir. Fakat immobilizasyonda ham proteaz kullanıldığı için ve dolayısıyla başka proteinler de bu ham ekstraktta bulunabileceği için immobilizasyon veriminin değerlendirilmesinde aktiviteye bağlı verim hesabının dikkate alınması daha sağlıklı olacaktır. Buna göre sadece ham enzim küreciklerde immobilize edildiğinde immobilizasyon verimi %65, ham enzim Co^{2+} iyonları ile birlikte immobilize edildiğinde ise %69 olarak bulunmuştur. Co^{2+} iyonları çilek proteazını aktive ettiğinden, immobilizasyon verimi Co^{2+} iyonları varlığında artmıştır.

İmmobilizasyon başarısını tanımlamak için kullanılan diğer terimler, “etkinlik” ve “aktivite geri kazanımı”dır. Etkinlik immobilize küreciklerin doğrudan ölçülen aktivitesi (gözlenen aktivite) ile hesaplanan aktivitesi (başlangıç aktivitesi - süzüntü aktivitesi) arasındaki korelasyonu işaret eder. İmmobilize ham proteaz için bu değer %63 iken, Co^{2+} iyonlarının da ham proteaz ile immobilizasyonu ile %89’a yükselmiştir. Aktivite geri kazanımı ise immobilize edilen enzimin immobilizasyonun ardından aktivitesini ne ölçüde koruyabildiği hakkında fikir verir. Benzer şekilde Co^{2+} iyonlarının ham proteaz ile immobilizasyonu ile birlikte aktivite geri kazanımı %41’den %61’e yükselmiştir. Aktivite geri kazanımının %41 olarak bulunması enzimin küreciklerde tutuklanması ile birlikte başlangıç aktivitesinde belirgin bir azalma olduğunu göstermektedir. Ancak, Co^{2+} iyonlarının da enzimle birlikte immobilize edilmesiyle bu inaktivasyon önemli ölçüde bertaraf edilmiştir. Co^{2+} iyonları, 1 mM gibi düşük bir konsantrasyonda kullanıldığından substrat/ürün difüzyonu açısından büyük bir engel teşkil etmemekle beraber, enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırdığından immobilizasyon işleminin başarısını olumlu yönde etkilemektedir. Bu parametrelerin ışığında çilek proteazının, Co^{2+} iyonları olmadan dahi, başarılı bir şekilde immobilize edildiği söylenebilir. Co^{2+} iyonlarının varlığı immobilizasyon başarısını beklenen doğrultuda arttırmıştır.

Bacillus subtilis MTCC 10422 süt çöktürücü proteaz enziminin aljinat-pektat jelde tutuklama yöntemiyle immobilize edildiği çalışmada immobilizasyon verimi

%97,78±4,05; etkinlik %74±0,02 ve aktivite geri kazanımı %73±0,04 olarak bulunmuştur [100]. *Bacillus mycoides* alkali proteaz enziminin farklı metodlarla immobilize edildiği çalışmada, her bir metod için farklı taşıyıcılar denenmiş ve ayrı ayrı immobilizasyon verimi hesaplanmıştır. Fiziksel adsorpsiyon yöntemi için çitin, çitosan, tanin-çitosan, tanin-sefaroze, seramik ve alümin taşıyıcıları kullanılmıştır ve bu yöntemle elde edilen immobilizasyon verimi %1,74 ile %18,8 arasında değişmektedir. İyonik bağlanma yöntemi için DEAE-Sefadeks A-25, Dowex-50W, Amberlit IR-120, Dowex 1×4 (Cl), DEAE-Selüloz ve Eceola-Selüloz taşıyıcıları kullanılmıştır ve immobilizasyon verimi %5,2 ile %15,02 arasında değişmektedir. Poliakrilamitte tutuklama yönteminde değişen çapraz bağlayıcı ajan konsantrasyonları için immobilizasyon verimi %35,84 ile %76,55 arasında değişmektedir. Son olarak kovalent bağlamayla immobilizasyon yöntemi için çitin, çitosan, alümin, CNBr-Sefaroze ve hidroksiapatit taşıyıcıları kullanıldığında elde edilen immobilizasyon veriminin %60,69 ile %79,29 arasında değiştiği belirlenmiştir. Sonuçlardan görüleceği üzere, fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlama gibi zayıf etkileşimlere dayalı yöntemlerde verim daha düşük iken, enzimin bir ortamda bulunmaya zorlandığı tutuklama yönteminde verim artmıştır. En yüksek immobilizasyon verimi ise kuvvetli bir bağlanmanın gerçekleştiği kovalent bağlama yöntemi ile elde edilmiştir [101].

Tablo 4.6. İmmobilizasyon işleminin verim, etkinlik ve geri kazanım sonuçları

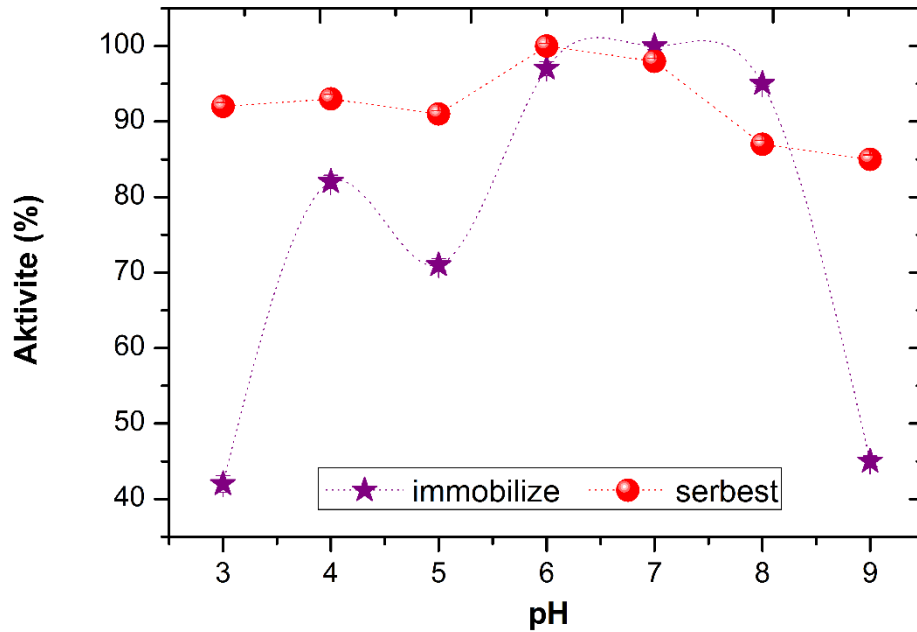
	İmmobilize enzim	İmmobilize enzim (1 mM Co ²⁺ ile birlikte)
Verim (protein) (%)	73±1,2	59±0,9
Verim (aktivite) (%)	65±0,4	69±0,7
Etkinlik (%)	63±0,4	89±0,3
Aktivite geri kazanımı (%)	41±1,1	61±0,8

*± değerler üçlü ölçümlerin standart sapma değerini ifade etmektedir.

4.4.4. İmmobilize enzimin özelliklerinin belirlenmesi

4.4.4.1. İmmobilize proteaz enziminin pH profili

İmmobilize proteaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin tayini için pH 3-9 arasındaki tamponlarla farklı pH değerlerinde aktivite ölçümleri yapılmış ve bu aktivite değerleri serbest enzimin aktivite değerleriyle birlikte bağıl aktivite (%) olarak Şekil 4.17.'de verilmiştir. İmmobilize enzim için maksimum aktivite pH 7'de elde edilmiştir. Yani çilek proteazı için optimum pH değerinin immobilizasyon sonucunda pH 6'dan pH 7'ye kaydığı görülmüştür. Fakat şunu da belirtmek gerekir ki hem serbest hem de immobilize enzim için pH 6 ve pH 7'deki aktivite değerleri birbirine çok yakındır. Dolayısıyla burada belirtilen optimum pH kayması kayda değer derecede büyük bir değişiklik değildir.

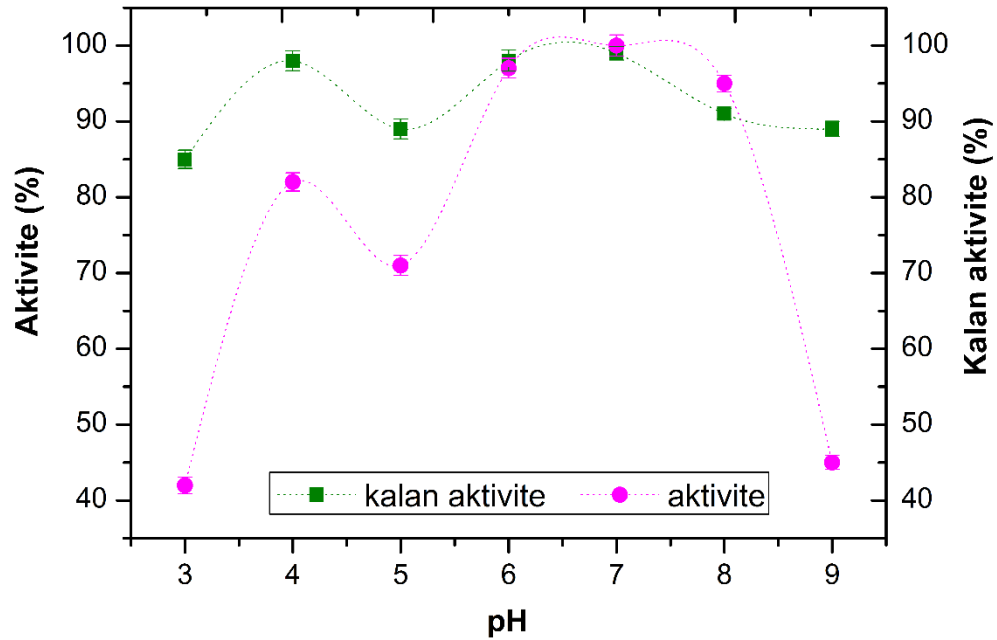


Şekil 4.17. İmmobilize ve serbest proteaz enziminin optimum pH grafiği

Bununla birlikte, bağıl aktivite sonuçları da serbest proteaza göre değişiklik arz etmektedir. Serbest proteaz için tüm pH değerlerinde birbirine yakın aktivite değerleri elde edilmişken enzimin immobilize edilmesi sonucunda asidik ve bazik pH'larda enzim aktivitesinde nötral pH'lara göre belirgin bir azalma gözlenmiştir.

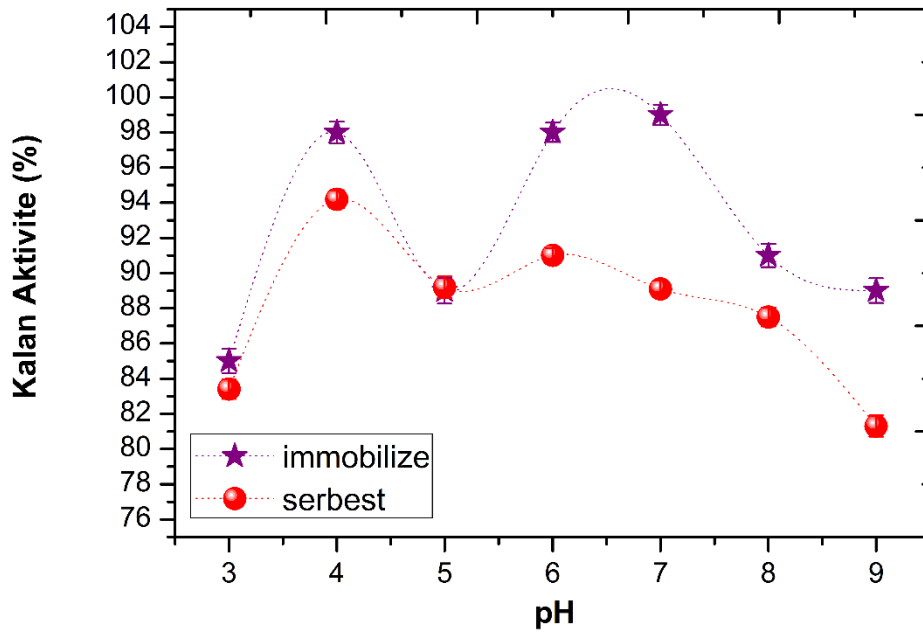
Taşıyıcı yüzeyinin ve immobilize enzimin mikro ortamının anyonik veya katyonik bir karaktere sahip olması enzimin optimum pH'ında 2 pH birimine kadar değişikliğe neden olabilmektedir. Bu duruma, enzimin etkili bir şekilde çalışabileceği pH bölgesinde genel bir genişleme de eşlik edebilir [102]. Dolayısıyla kürecik yüzeyindeki ve enzim yapısındaki yüklü grupların neden olduğu etkileşimler bu değişikliklere neden olmuş olabilir. Benzer şekilde, bir başka serin proteaz olan dipeptidilpeptidaz IV (DPP IV) enziminin Ca-aljinat küreciklerde immobilizasyonu neticesinde optimum pH değerinde bazik tarafa doğru 0,5 birimlik bir kayma olduğu belirtilmiştir [97]. Bir diğer çalışmada, Ca-aljinat küreciklerde tutuklanan bir sistein proteaz olan Araujain'in optimum pH değerinin de immobilizasyonla birlikte 8,5'ten 8'e kaydığı bildirilmiştir [98].

İmmobilize enzimin kararlılık çalışmalarında, pH 3-9 arasındaki tamponlarla enzim 3 saat inkübe edildiğinde tüm pH değerlerinde aktivitesinin büyük kısmını koruduğu gözlenmiştir (Şekil 4.18.). İnkübasyon süresi sonunda kontrole kıyasla en fazla aktivite kaybı pH 3'de %15 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre geniş bir pH aralığında immobilize çilek proteazının kararlılığı oldukça yüksektir.



Şekil 4.18. İmmobilize proteaz enziminin optimum pH ve pH kararlılığı grafiği

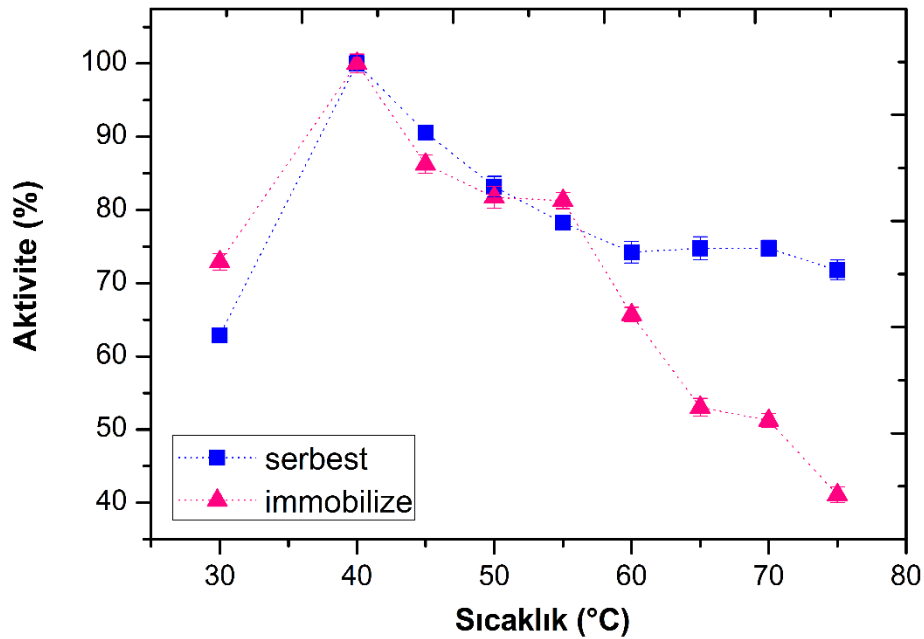
İmmobilize edilmiş enzimlerin kararlılığı taşıyıcının türüne ve enzim ile taşıyıcı arasındaki etkileşime bağlı olarak artabilir veya azalabilir. İmmobilizasyon sırasında; immobilizasyon matriksi, immobilizasyon koşulları ve çok noktaya bağlanma ile katılma (rijitleşme) gibi parametreler enzim kararlılığının önemli belirleyicileridirler [51]. İmmobilize enzimin pH kararlılığı sonuçları ile serbest enzim için belirlenen pH kararlılığı sonuçları kıyaslandığında tüm pH değerlerinde kararlılığın serbest enzime göre arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, Şekil 4.19.'dan da görülebileceği üzere, immobilizasyon işleminin enzimin kararlılığını belirgin şekilde arttırdığı rahatlıkla söylenebilir. Çilek proteazıyla benzer bir biçimde, Araujiain sistein proteazının Ca-aljinat küreciklerdeki immobilizasyonu ile test edilen tüm pH değerlerinde kararlılığında bir artış olduğu belirlenmiştir [98]. Çilek proteazından farklı olarak ise Dipeptidilpeptidaz IV (DPP IV) serin proteazının Ca-aljinat küreciklerde tutuklanmasının ardından nötral pH değerlerindeki kararlılığı değişmezken, asidik ve bazik pH değerlerindeki kararlılığında artış meydana gelmiştir ve bu artış çilek proteazındaki kadar belirgin değildir [97].



Şekil 4.19. İmmobilize ve serbest proteaz enziminin pH kararlılığı grafiği

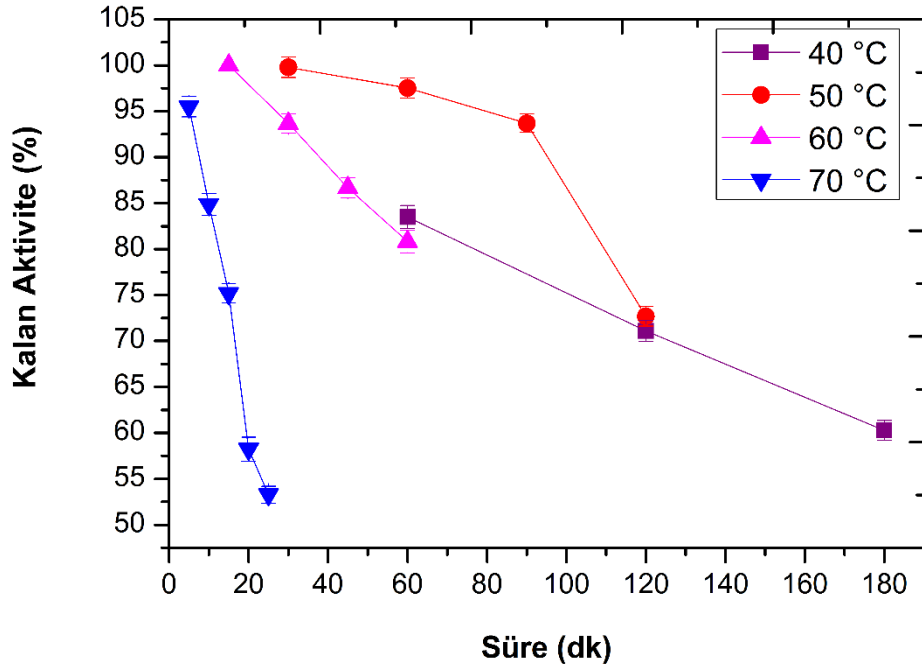
4.4.4.2. İmmobilize proteaz enziminin termal profili

İmmobilize proteaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın tayini için 30-75 °C arasındaki sıcaklıklar denenmiş ve maksimum aktivite 40 °C’de elde edilmiştir (Şekil 4.20.). Yani çilek proteazı immobilize edildiğinde optimum pH değerinde bir değişiklik olmamıştır. Marathe ve ark., gerçekleştirdikleri çalışmada deniz suyundan izole ettikleri *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Alcaligenes faecalis* bakterilerini alkali proteaz üretiminde kullanmışlardır. Ardından her bir enzimi ayrı ayrı Ca-ajinat küreciklerde immobilize edip, hem serbest hem de immobilize enzimleri karakterize etmişleridir. Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Alcaligenes faecalis* bakterilerinden elde edilen serbest alkali proteaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 55 °C, 50 °C ve 55 °C olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyonun ardından *Pseudomonas aeruginosa* ve *Alcaligenes faecalis* alkali proteazlarının optimum sıcaklık değerleri değişmezken, *Bacillus subtilis* alkali proteazının optimum pH değeri 55 °C’den 60 °C’ye kaymıştır [103].



Şekil 4.20. İmmobilize ve serbest proteaz enziminin optimum sıcaklık grafiği

İmmobilize proteazın termal kararlılığını belirlemek amacıyla enzim 40-70 °C arasındaki sıcaklıklarda bölüm 3.3.2.4.2.'de bahsedildiği gibi inkübasyona bırakılmıştır. İmmobilize enzimin 40 °C'de 1 saat inkübasyonu neticesinde aktivitesinin çok küçük bir kısmını kaybettiği, 2 saat inkübasyonu neticesinde aktivitesinde az miktarda azalma olduğu, 3 saat inkübe edildiğinde ise aktivitesinin halen %60'ını koruduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, enzimin 50 °C'de 90 dk sonunda aktivitesinin büyük çoğunluğunu koruduğu, 120 dk sonunda ise sadece %28'ini kaybettiği görülmüştür. 60 °C'de ise 15. dk'nın sonunda enzim aktivitesinde hiçbir azalma olmazken, enzimin 60 dk'lık inkübasyon süresinin sonunda aktivitesinin sadece %20'lik bir kısmını kaybettiği tespit edilmiştir. Son olarak 70 °C gibi yüksek bir sıcaklık değerinde enzimin 15. dk'nın sonuna kadar aktivitesinin %75'ini koruması, 30 dk sonunda ise halen aktivitesinin yarısını koruması önemli bir bulgudur (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. İmmobilize proteaz enziminin termal kararlılık grafiği

İmmobilizasyon, bir enzimin kararlılığını büyük ölçüde etkileyebilir. İmmobilizasyon işlemi, enzimde bir rijitleşmeye neden olursa, bu durum, enzimlerin denatüre edici koşullar altında (örneğin, daha yüksek sıcaklıklar veya yüksek pH) inaktivasyonunu teşvik etme eğilimindedir. Bununla birlikte, enzim ve destek arasında gergin olmayan bir tür çok noktali bağlanma olduğunda, muazzam bir kararlılık meydana gelebilir. Bu, esas olarak, temel protein yapısındaki büyük yapısal değişikliklerin fiziksel olarak önlenmesinden kaynaklanır [104]. Çilek proteazının tutuklama yöntemiyle immobilizasyonu neticesinde pH kararlılığında olduğu gibi termal kararlılığında da önemli bir artış gerçekleşmiştir. Özellikle ilgili sıcaklık değerlerindeki daha uzun inkübasyon süreleriyle birlikte kararlılıktaki bu artış daha da belirgin hale gelmiştir. Örneğin 50 °C’de 30 dk’lık inkübasyon sonucunda serbest proteaz aktivitesinin %92,23’ünü, immobilize proteaz ise %99,77’sini korumuştur. Aradaki fark çok büyük değildir. Oysa aynı sıcaklık değerinde 60, 90 ve 120 dk’lık inkübasyon sürelerinin sonunda immobilize proteaz için elde edilen kararlılık ölçümleri serbest proteaz için elde edilen ölçümlere göre oldukça yüksektir ve süre arttıkça aradaki fark açılmaktadır. *Bacillus subtilis* MTCC 10422’den saflaştırılan bir süt çöktürücü proteazın aljinat-pektat jelde tutuklanarak immobilize edildiği bir çalışmada serbest ve immobilize enzimin 40 °C–70 °C sıcaklık aralığındaki termal kararlılığı detaylı olarak incelenmiştir. Bulgulara göre, çilek proteazına benzer şekilde, immobilizasyon sonucunda termal olarak enzim daha kararlı hale gelmiştir ve sıcaklık değeri arttıkça kararlılıktaki artış da belirginlik kazanmıştır [100].

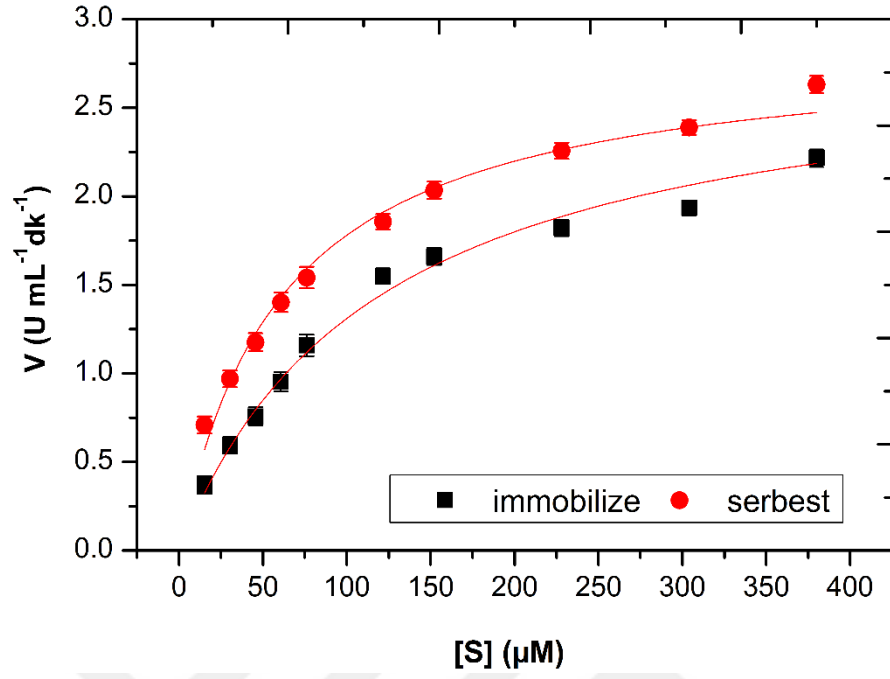
4.4.4.3. İmmobilize proteaz enziminin BSA hidrolizine ait kinetik parametreler

İmmobilize ham proteaz enzimiyle gerçekleştirilen denemede; BSA hidrolizinin kinetik parametrelerini belirlemek amacı ile 0,015 ve 0,38 mM (15,2 - 380 µM) konsantrasyon aralığında substrat çözeltileri kullanılarak bölüm 3.3.1.6.’da belirtildiği gibi başlangıç hızı değerleri ölçülmüştür (Şekil 4.22.). Ölçülen başlangıç hızlarının resiprokal değerlerine (1/V) karşı başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerinin (1/[S]) işaretlenmesiyle Lineweaver-Burk diyagramı elde edilmiştir. Oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramı Şekil 4.23.’de verilmiştir. Kinetik sabitlerin immobilizasyon ile değişiminin doğru bir şekilde belirlenebilmesi

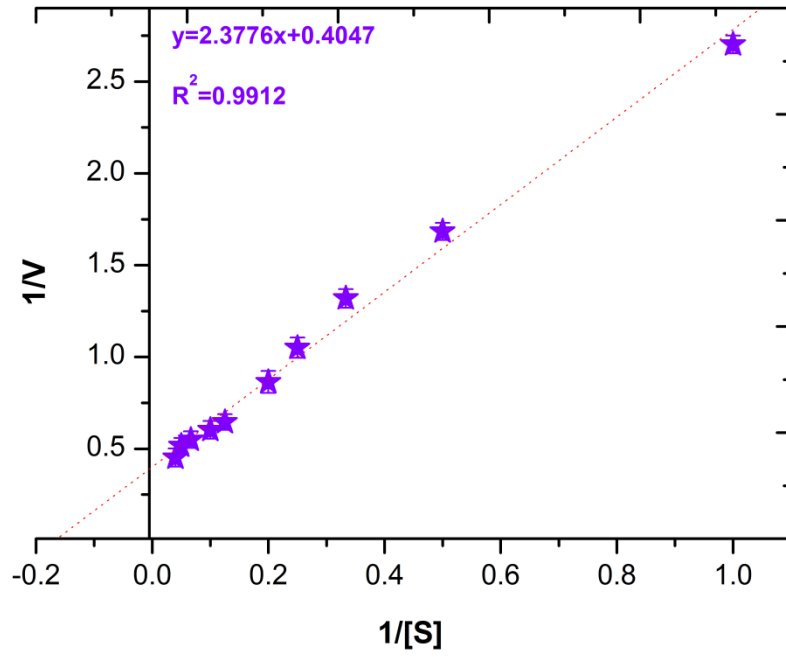
amacıyla serbest ham enzimin de aynı koşullar altında K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.24.).

Oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramlarından, 40 °C ve pH 6'daki BSA hidrolizinin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla serbest ham proteaz enzimi için 0,041 mM ve 2,48 $\mu\text{mol tirozin mL}^{-1} \text{ dk}^{-1}$, immobilize ham proteaz enzimi için ise 0,089 mM ve 2,47 $\mu\text{mol tirozin mL}^{-1} \text{ dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

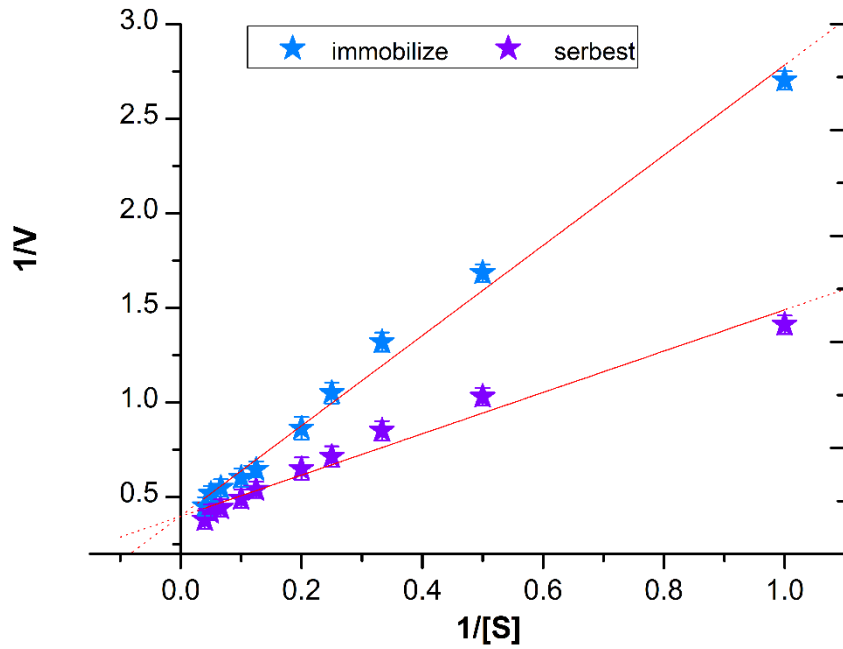
Serbest ve immobilize çilek proteazının BSA hidrolizine ait K_m ve V_{max} değerleri kıyaslandığında, aynı substrat için enzimin kinetik sabitlerinin değiştiği belirlenmiştir. V_{max} değerindeki önemsiz sayılabilecek bir azalmaya K_m değerindeki belirgin bir artış eşlik etmiştir. Buna göre, immobilizasyon neticesinde K_m değerindeki artış, enzimin BSA substratına afinitesinin azaldığı şeklinde yorumlanabilir. Genel olarak, immobilize edilmiş bir enzimin kinetik davranışı, serbest çözeltideki aynı enziminkinden önemli ölçüde farklı olabilir. Bir enzimin özellikleri, uygun immobilizasyon protokolünün seçimi ile modifiye edilebilirken, aynı yöntem, farklı enzimler üzerinde önemli ölçüde farklı etkilere sahip olabilir. Bu değişiklikler, immobilizasyon prosedürüne veya immobilizasyonda kullanılan desteğin mevcudiyetine ve yapısına bağlı olarak enzimdeki konformasyonel değişikliklere bağlı olabilir [104]. Ham çilek proteazının BSA substratı için K_m değerinin artması büyük ölçüde difüzyon problemlerinden kaynaklanıyor olabilir. Benzer biçimde, *Aspergillus* sp. As#6 ve As#7 suşlarından kısmi olarak saflaştırılan iki ayrı proteazın da Ca-aljinat küreciklerde immobilizasyonları neticesinde kazein substratı için elde edilen K_m değerlerinde artış meydana gelmiştir. K_m değeri As#6 suşu proteazı için 4,5 mg/mL'den 5 mg/mL'ye, As#7 suşu proteazı için 2,5 mg/mL'den 2,6 mg/mL'ye yükselmiştir [105].



Şekil 4.22. İmmobilize ve serbest hamproteaz enziminin BSA substratına ait Michaelis-Menten grafiği



Şekil 4.23. İmmobilize proteaz enziminin BSA substratına ait Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.24. İmmobilize ve serbest ham proteaz enziminin BSA substratına ait Lineweaver-Burk grafiği

4.4.4.4. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirlik sonuçları

Tekrar kullanılabilirlik, immobilizasyonun enzime sağladığı en önemli avantajlardan biridir. Ekonomik açıdan bakıldığında, endüstriyel uygulamalarda kullanılan biyokatalizörün tekrar kullanılabilirliğini kontrol etmek oldukça gereklidir [106]. İmmobilize çilek proteazının tekrar kullanılabilirlik çalışmasında bölüm 3.3.2.4.4.'de anlatıldığı şekilde aynı küreciklerin altı kez aktivitesi ölçülmüştür. Aktivite ölçümü standart koşullar altında yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Tablo 4.7.'de verilmiştir. Sonuçlara göre, immobilize küreciklerin üçüncü kullanımında aktivitenin %62'si hala korunurken dördüncü kullanım ve sonrasında aktivitede ciddi düşüşler yaşandığı görülmüştür.

Boşluklu-mezopor silika nanosferleri üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş alkali proteaz enziminin tekrar kullanılabilirlik sonuçlarına bakıldığında çilek proteazından daha kararlı olduğu görülmektedir. İmmobilize alkali proteazın on ve on iki kez art arda kullanımının ardından başlangıçtaki aktivitesinin sırasıyla %65,3 ve %55,6'sını koruyabildiği bildirilmiştir [107]. Bir ticari proteaz olan Esperaz,

Eudragit S-100 polimerine kovalent olarak bağlanarak immobilize edilmiştir. Gerçekleştirilen çalışma sonucunda enzimin tekrar kullanılabilirlik özelliği oldukça yüksek bulunmuştur. Eudragit–Esperaz konjugatı beş kez kullanımının ardından başlangıç aktivitesinin halen %73'ünü korumaktadır [108]. Bir diğer kovalent bağlama ile immobilizasyon çalışması olan, ticari alkali proteazın vermikülit üzerine immobilizasyonunda, immobilize proteaz beş kez kullanıldıktan sonra dahi aktivitesinde ancak %22'lik bir kayıp yaşandığı görülmüştür [109]. Tüm bu immobilize proteaz örneklerinin tekrar tekrar kullanımdaki yüksek kararlılıkları, ilgili taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmış olmalarıyla ilişkilendirilebilir. Enzim taşıyıcıya kuvvetle bağlandığından tekrar kullanımlarda taşıyıcıdan ayrılmayarak yüksek kararlılık sergilemektedir. Çilek proteazının Ca-aljinat küreciklerde immobilizasyonunda ise tekrar kullanılabilirliğin ortalama düzeyde kalması, immobilize enzimin kullanım sayısı arttıkça taşıyıcı küreciklerin gözeneklerinden enzim kaçıışı olduğunu düşündürmektedir. Ca-aljinat küreciklerde immobilize edilmiş dipeptidilpeptidaz IV (DPP IV) serin proteazının tekrar kullanılabilirlik sonuçlarının çilek proteazı ile büyük benzerlik göstermesi de bu düşüncüyü destekler niteliktedir [97]. Bununla birlikte, *Labeo rohita*'dan saflaştırılan ve Ca-aljinat küreciklerde immobilize edilen viseral proteazın tekrar kullanılabilirliğinin çilek proteazından çok daha düşük olduğu görülmektedir. Enzimin üçüncü kullanım sonunda aktivitesi başlangıç aktivitesinin %25'ine düşerken, dördüncü kullanımda aktivite gözlenmemiştir [110].

Tablo 4.7. Immobilize enzimin tekrar kullanılabilirlik sonuçları

Kullanım Sayısı	Bağıl Aktivite (%)*
1	100
2	86,3±0,39
3	61,7±0,57
4	31,5±0,55
5	20,6±0,73
6	17,3±0,89

*± değerler üçlü ölçümlerin standart sapma değerini ifade etmektedir.

4.4.4.5. İmmobilize enzimin depolanma kararlılığı sonuçları

Çilek proteazını içeren immobilize küreciklerin depolanma kararlılığının belirlenmesi amacıyla kürecikler iki farklı sıcaklıkta (4 °C ve 25 °C) depolanıp 8 hafta boyunca aktivite değerleri kaydedilmiştir. Ayrıca, immobilizasyon işleminin enzimin depolanma kararlılığını nasıl etkilediğinin anlaşılması için serbest enzim de aynı koşullarda depolanıp aktivitesi aynı düzenli aralıklarla kaydedilmiştir. Aktivite ölçümü standart koşullar altında yapılmıştır. Depolanma kararlılığı sonuçları Şekil 4.25.'de verilmiştir.

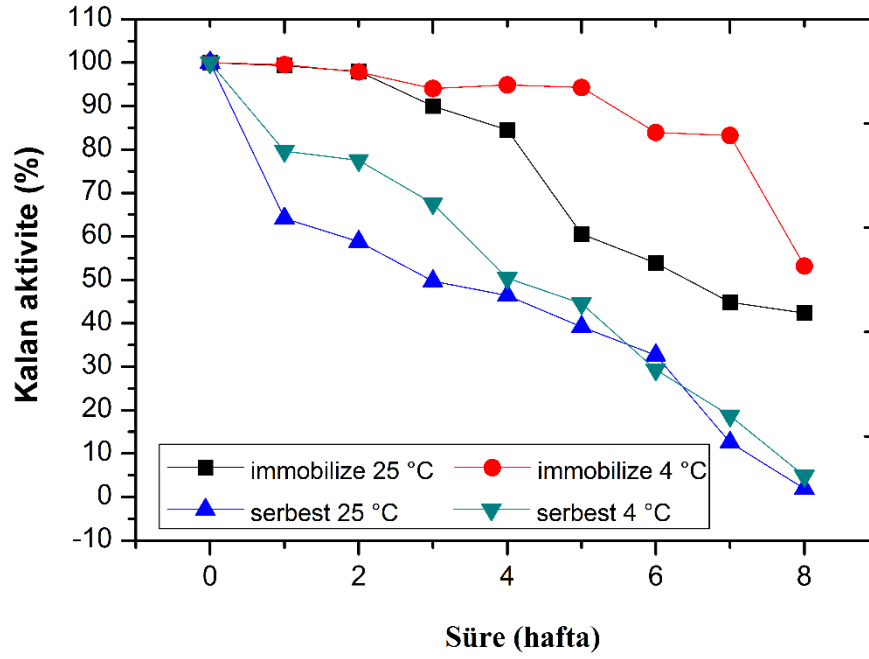
İmmobilize kürecikler 4 °C'de saklandığında 7 hafta boyunca aktivitesini büyük ölçüde korumuştur. Bu 7 haftalık sürenin sonunda küreciklerin hala başlangıç aktivitesinin %83'üne sahip olduğu, ancak 8 haftalık sürenin sonunda küreciklerin aktivitesinde %46,8'lik bir kayıp olduğu belirlenmiştir. Serbest enzim 4 °C'de saklandığında 4 haftalık sürenin sonunda aktivitesinin yarısını kaybetmiştir, 5. haftadan sonra ise aktivitede hızlı bir düşüş gözlenmektedir. Toplam 8 haftalık sürenin sonunda serbest enzim başlangıç aktivitesinin yalnızca %4,9'unu koruyabilmiştir.

İmmobilize kürecikler 25 °C'de saklandığında 4 haftalık sürenin sonunda başlangıç aktivitesinde yalnızca %15,5'lik bir kayıp gözlenmektedir. Bununla beraber, 4 ile 8 haftalık depolanma süresinde ise aktivitede daha belirgin bir azalma meydana gelmiştir. Sonuçlara göre, 6 haftalık sürenin sonunda küreciklerin başlangıç aktivitesinde %46,1'lik, 8 haftalık sürenin sonunda ise %57,7'lik bir azalma meydana gelmiştir. Başlangıç aktivitesindeki en belirgin azalma, 25 °C'de saklanan serbest enzimde meydana gelmiştir. Serbest enzim, 3 haftalık sürenin sonunda aktivitesinin yarısını, 6 haftanın sonunda %67,3'ünü kaybetmiştir. Toplam 8 haftalık sürenin sonunda serbest enzim neredeyse tamamen aktivitesini kaybetmiştir.

Çilek proteazının depolanma kararlılığı sonuçlarına genel olarak bakıldığında, hem serbest hem de immobilize enzimin 4 °C'de 25 °C'ye göre daha kararlı olduğu ve

immobilizasyon işleminin her iki depolanma sıcaklığında da enzimin kararlılığını belirgin şekilde arttırdığı söylenebilir.

Su ve ark.'nın gerçekleştirdikleri çalışmada bir alkali proteaz enzimi grafen oksit (GO) nano yaprakları üzerine immobilize edilmiştir. Hem serbest hem de immobilize enzim pH 7 fosfat tamponu içerisinde 4 °C'de depolanarak 5 günde bir düzenli olarak aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, 25 günlük depolanmanın ardından serbest enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık %73'ünü, GO-immobilize enzimin ise yaklaşık %85'ini koruduğu kaydedilmiştir. Immobilizasyonun enzimin kararlılığını arttırdığı görülmektedir [111]. Bir başka çalışmada, fonksiyonelleştirilmiş mezopor aktif karbon parçacıkları üzerine immobilize edilmiş asit proteazın pH 7 fosfat tamponu içerisindeki depolanma kararlılığı 4 °C'de incelenmiştir. Beş haftalık depolanmanın neticesinde serbest enzim aktivitesinin %18'ini, immobilize enzim ise ancak %50'sini koruyabilmiştir [112]. Immobilize çilek proteazının 4 °C'de her iki enzimden de daha kararlı olduğu söylenebilir. Bunun yanında çilek proteazına kıyasla depolanma kararlılığı daha yüksek olan proteazlar da bildirilmiştir. Örneğin çitosan küreciklerde immobilize edilmiş pepsin enzimi 5 °C'de 70 gün boyunca depolanmış ve ölçülen aktivite değişimi serbest enzimle kıyaslamalı olarak verilmiştir. Bu sonuçlara göre, 70 günün sonunda serbest enzimin halen aktivitesinin yaklaşık %40'ını, immobilize enzimin ise yaklaşık %60'ını koruduğu gözlenmiştir [113].



Şekil 4.25. İmmobilize ve serbest proteaz enziminin depolanma kararlılığı grafiği

4.5. Çilek Proteazının Uygulama Alanlarının Araştırılması

4.5.1. Çilek proteazının deterjan katkı maddesi olarak kullanımının araştırılması

4.5.1.1. Oksitleyici maddelerin, yüzey aktif maddelerin ve deterjanların enzim kararlılığı üzerindeki etkisi

İyi bir deterjan enziminin yıkama esnasında etkili olabilmesi için, deterjan formülasyonunda mevcut olabilecek yüzey aktif maddelerle, oksitleyici maddelerle ve diğer katkı maddeleri gibi yaygın olarak kullanılan deterjan bileşikleriyle uyumlu ve kararlı olması gerekmektedir. Bu yüzden çilek proteazının deterjan katkı maddesi olarak uygunluğunun araştırılması amacıyla öncelikle ham enzim ekstraktı çeşitli yüzey aktif maddeler ve oksitleyici ajanlarla muamele edilip aktivitesindeki değişim incelenmiştir. Bu amaçla, serbest ve immobilize enzim SDS, Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Brij 35 gibi çeşitli yüzey aktif maddelerin ve buna ek olarak hidrojen peroksit ve sodyum perborat oksitleyici maddelerinin varlığında 40 °C'de 1 saat

inkübe edildikten sonra kalan enzim aktiviteleri (%) standart analiz koşulları altında belirlenmiştir (Tablo 4.8.).

Çilek proteazının iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin varlığında oldukça kararlı olduğu belirlenmiştir. Brij 35 varlığında hem serbest hem de immobilize çilek proteazlarının aktiviteleri kontrole kıyasla neredeyse değişmeden kalmıştır. Tween 20 varlığında 40 °C'de 1 saat inkübasyondan sonra serbest enzimin aktivitesinde %10,28'lik bir azalma meydana gelmiştir. Enzimin immobilize edilmesiyle bu aktivite kaybının az da olsa azaldığı gözlenmiştir. Co^{2+} iyonlarının da enzimle birlikte immobilize edilmesiyle ise enzim aktivitesinde herhangi bir kayıp yaşanmadığı belirlenmiştir. Co^{2+} iyonlarının çilek proteazı üzerindeki stimülasyon etkisi sonucunda, enzimin yüzey aktif maddeye karşı kararlılığı artmıştır. Tween 80 ve Triton X-100 için elde edilen sonuçlar Tween 20 için elde edilen sonuçlarla oldukça benzerlik göstermektedir.

Tablo 4.8. Yüzey aktif maddelerin ve oksitleyici maddelerin çilek proteazının kararlılığı üzerindeki etkisi

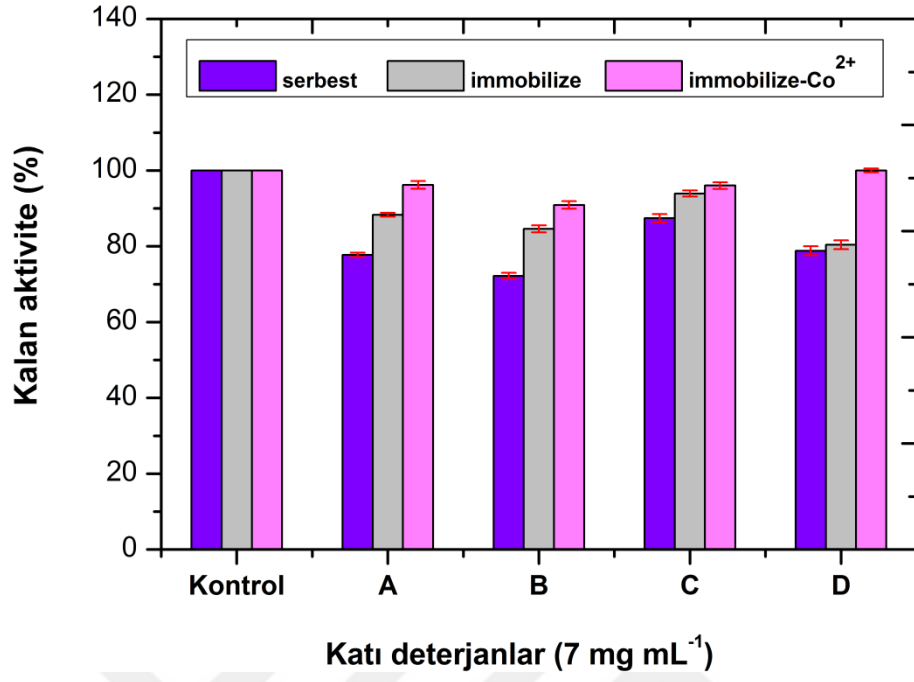
Deterjan bileşenleri	Konsantrasyon (%)	Kalan aktivite (%) *		
		Serbest enzim	İmmobilize enzim	İmmobilize enzim - Co ²⁺
Kontrol		100	100	100
Yüzey aktif maddeler				
SDS	0,5	97±1,0	98±1,1	100±0,06
Triton X-100	1	90±0,4	92±0,5	97±0,6
Tween 20	1	90±0,5	90±0,8	100±0,7
Tween 80	1	96±0,4	97±0,5	100±0,4
Brij 35	0,1	98±0,8	98±0,6	99±0,8
Oksitleyici maddeler				
H ₂ O ₂	0,5	53±0,7	54±0,9	56±0,8
NaBO ₃	0,2	89±0,6	100±0,8	100±0,3

*± değerler üçlü ölçümlerin standart sapma değerini ifade etmektedir.

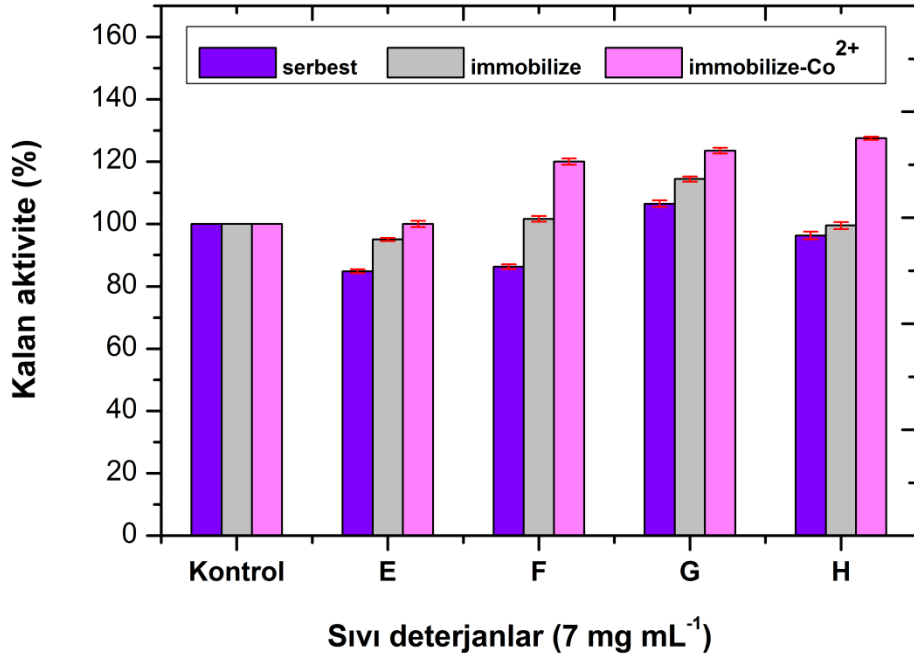
Serbest ve immobilize çilek proteaz enzimleri, oldukça güçlü bir anyonik yüzey aktif madde olan SDS varlığında aktivitesinin çoğunu muhafaza etmeyi başarmıştır. Enzim aktivitesinde gözlemlenen önemsiz sayılabilecek düzeydeki azalma Co^{2+} iyonlarının da enzimle birlikte immobilize edilmesiyle tamamen bertaraf edilmiştir. Pek çok enzimin SDS varlığında inhibisyona uğraması sebebiyle bu önemli bir bulgudur [114].

Ham çilek proteazı hidrojen peroksit ve sodyum perborat oksitleyici maddelerine karşı farklı davranışlar sergilemiştir. Sodyum perborat varlığında serbest proteazın aktivitesinde kontrole kıyasla %11,45'lik bir inhibisyon meydana gelirken, immobilize enzimlerin aktivitesinde herhangi bir azalma görülmemiştir. Buna karşın hidrojen peroksit varlığında, çok ufak farklılıklar gözlenmekle birlikte, tüm enzim örnekleri için aktivite neredeyse yarıya inmiştir.

Bunların dışında, bazı ticari deterjanların çilek proteazı üzerine etkisi ayrıca araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan A, B, C ve D katı deterjanları varlığındaki kararlılık sonuçları Şekil 4.26.'da ve E, F, G ve H sıvı deterjanları varlığındaki kararlılık sonuçları Şekil 4.27.'de verilmiştir. Test edilen tüm katı deterjanlar çilek proteazı üzerinde inhibisyon etkisi yaratmıştır. Bu etki en fazla serbest enzimde kendini göstermektedir. İmmobilizasyon işlemi, tıpkı deterjan katkı maddelerinde olduğu gibi burada da enzimin kararlılığını arttırmıştır. Yine benzer şekilde Co^{2+} iyonlarının varlığı enzimi stimüle ettiğinden kararlılık düzeyini daha da yukarı taşımıştır. A, B ve C için benzer sonuçlar elde edilmiştir. D katı deterjanının serbest ve immobilize çilek proteazı aktivitesi üzerinde yarattığı, bir nebze daha fazla olan inhibisyon etkisinin, enzimin Co^{2+} iyonları ile immobilize edilmesiyle birlikte tamamen ortadan kalktığı gözlenmiştir.



Şekil 4.26. Ticari katı deterjanların proteaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.27. Ticari sıvı deterjanların proteaz aktivitesi üzerine etkisi

Sıvı deterjanlarla gerçekleştirilen denemede ise daha farklı sonuçlar elde edilmiştir. E, F ve H sıvı deterjanları serbest proteazı düşük düzeyde inhibe etmiştir. Sıvı E deterjanı kullanıldığında immobilize enzim üzerindeki inhibisyon etkisi yalnızca %5 olarak bulunmuştur ve Co^{2+} iyonları ile immobilize edilmiş enzimde inhibisyon gözlenmemiştir. Sıvı H deterjanı varlığında immobilize enzimde herhangi bir inhibisyon gözlenmezken, Co^{2+} iyonları ile immobilize edilmiş enzimin aktivitesinde artış olduğu saptanmıştır. F ve G sıvı deterjanlarının ise her iki immobilize enzim örneğini de aktive ettiği görülmüştür. Bu deterjanlar arasında sadece G hem serbest hem de immobilize enzimleri aktive etmiştir. Bazı deterjanlar varlığında enzim aktivitesindeki kısmi kayıp, bu deterjanların bileşenlerinden kaynaklanan inhibisyon etkisine bağlanabilir. Bunun yanında, deterjanların bazı bileşenleri enzim için aktivatör olarak da davranabilir. Sonuçta bu deterjanlar varlığında, kontrol ile karşılaştırıldığında, enzim aktivitesinde artış gözlenir [115]. Ticari deterjanların enzimi az da olsa inhibe ettiği açıktır ve immobilizasyon bu etkiyi büyük ölçüde minimize etmektedir. Ayrıca Co^{2+} iyonları proteazı stimüle ederek kararlılığını daha da arttırmaktadır. Hatta sıvı deterjan etkisi sonuçlarına bakıldığında bu deterjanların formülasyonlarında enzimi aktive edebilecek bazı maddelerin bulunduğu ve bu aktivasyonun Co^{2+} iyonlarının stimülasyon etkisiyle birleşerek sonuçlara yansıdığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, hidrojen peroksit hariç, test edilen tüm oksitleyiciler, yüzey aktif maddeler ve deterjanlara karşı çilek proteaz enziminin yüksek bir kararlılık sergilediği görülmüştür. Enzim örneklerinin hidrojen peroksit karşı oldukça hassas olduğu söylenebilir.

Sinha ve Khare'nin gerçekleştirdikleri çalışmanın sonuçlarına göre *Bacillus* sp. EMB9 proteazının SDS, Tween 80 ve Triton-X 100 varlığında çilek proteazına benzer şekilde oldukça kararlı olduğu bulunmuştur. Çalışmada ayrıca EMB9 proteazının A deterjanı gibi çeşitli ticari deterjanlarla da uyumlu olduğu bildirilmiştir [21]. Benzer şekilde *Bacillus subtilis* DM-04'den saflaştırılan bir serin proteaz olan Alzwiprase'nin da SDS, Triton-X 100, Tween 20 ve Tween 80 varlığında yüksek bir kararlılığa sahip olduğu bildirilmiştir [115]. *Bacillus mojavensis* A21'den

saflaştırılan BM1 ve BM2 isimli iki serin proteaz enziminin de deterjan bileşeni olarak uyumlulukları test edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, her iki enzimin de A katı deterjanı ve Tween 20 varlığındaki kararlılıkları çilek proteazı ile benzerlik göstermektedir. Bunun yanında farklı sonuçlar da göze çarpmaktadır. BM1 ve BM2'nin hidrojen peroksit varlığında çilek proteazına göre kararlılıkları daha yüksektir. SDS, Triton-X 100 ve sodyum perborat varlığında ise çilek proteazı daha yüksek bir kararlılık sergilemiştir [116]. Bir başka çalışmada *Pseudomonas aeruginosa*'dan elde edilen ham proteaz enziminin E, F ve H ticari deterjanlarının varlığında kararlılığı test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ham proteazın 30 °C'de 1 saatlik inkübasyonun ardından H deterjanı varlığında kararlılığını koruduğu, F ve E varlığında ise aktivitesinde ciddi kayıplar meydana geldiği belirlenmiştir [117].

4.5.1.2. Yıkama performansının değerlendirilmesi

Deterjan proteazları, yıkama çözeltisindeki büyük ve çözünmeyen proteinleri hidrolizleyerek en iyi şekilde çalışır. Proteinler kumaş yüzeyinden başlangıçta deterjan bileşenleri ile veya tek başına su ile çıkarılır. Kumaştan ayrılan parçalar, büyüklüklerine bağlı olarak ya yıkama çözeltisinde çözünürler ya da kendilerini tekrar kumaşa bırakırlar. Bu süreçte deterjan formülasyonunda kullanılan enzimler, substrat hidrolizi sayesinde daha iyi leke çıkarma ve yeniden tortulaşmayı önleme yararları ile deterjan etkinliğine katkı sağlarlar [114]. Bir deterjan katkı maddesi olarak çilek proteazının yıkama performansının değerlendirilmesi amacıyla öncelikle temiz pamuklu bez parçaları ketçap, çikolata sosu ve barbekü sosu ile kirletilmiştir. Sonraki aşamada soslarla kirletilen kumaş parçaları musluk suyu, deterjanlı musluk suyu ve enzim ilaveli deterjanlı musluk suyunda ayrı ayrı yıkanmış ve durulanmıştır. Durulanan kumaş parçaları oda koşullarında kurutulduktan sonra sonuçlar görsel olarak incelenerek lekelerin çıkarılmasında çilek proteaz enziminin etkisi incelenmiştir (Şekil 4.28. - 4.34.).

Elde edilen sonuçlar, çilek ham enziminin ketçap, çikolata ve barbekü sosu gibi çeşitli lekeleri etkili bir şekilde temizleyebildiğini göstermektedir. Şekil 4.34.'deki sonuçlara bakıldığında su ile yıkanmış lekeli kumaşlarda yalnızca lekelerin renginde hafif bir açılma görülmektedir, lekeler kumaşlardan temizlenememiştir. Yıkama suyuna deterjan katıldığında her bir lekenin silikleştiği fakat tamamen temizlenmediği gözlenmiştir. Deterjan barbekü sosunu büyük ölçüde kumaştan temizlemiştir, son durumda kumaşa belli belirsiz bir leke görülmektedir. Fakat ketçap ve çikolata sosu ile oluşturulmuş lekelerin çoğu deterjanlı suyla yıkama sonucunda hala belirgin bir şekilde kumaşa görülmektedir. Yıkama çözeltisine enzim de eklendiğinde oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir. Serbest ham proteazı içeren yıkama çözeltisinin barbekü sosu lekesini kumaştan tamamen temizlediği, deterjanın çıkaramadığı ketçap ve çikolata sosu lekelerinin ise neredeyse tümünü temizlediği görülmektedir. Yıkama çözeltisine immobilize proteaz ve Co^{2+} iyonları ile immobilize edilmiş proteaz enzimleri eklendiğinde tüm lekelerin kumaşlardan etkili bir şekilde tamamen temizlendiği belirlenmiştir. İmmobilizasyon işlemi ham proteazın kararlılığını arttırdığından, serbest enzime kıyasla immobilize enzimlerle bir nebze de olsa daha iyi sonuçlar alınmıştır. Enzim ortam koşullarından etkilenmeden daha etkin bir şekilde çalışmaktadır. Anlaşılan o ki, Co^{2+} iyonlarının stimülasyon etkisi olmasa bile immobilize ham proteaz zor lekeleri temizlemede üstün bir katkı maddesi özelliği göstermektedir. Burada proteaz, kumaşa kuvvetle yapışan büyük çözünmez protein parçalarını hidrolizleyerek, lekeyi güçlü bir şekilde uzaklaştırması için deterjanın etkisini arttırmaktadır [114].

Jellouli ve ark.'nın gerçekleştirdikleri çalışmada, kan lekesinin giderilmesi amacıyla *Bacillus licheniformis* MP1 serin proteazının yıkama performansı değerlendirilmiştir. Sonuçta, enzim ve çeşme suyunu içeren yıkama çözeltisi kan lekelerinin görünümünü belirgin şekilde azaltırken, deterjanın da yıkama çözeltisine eklenmesiyle kan lekelerinin pamuk kumaşlardan tamamen giderildiği gözlenmiştir [118]. Alkali proteazları içeren *B. licheniformis* NH1 ham ekstraktı ile gerçekleştirilen başka bir yıkama performansı çalışmasında ham enzim pamuk kumaşlardan kan, çikolata sosu ve barbekü sosu lekelerinin giderilmesi amacıyla test edilmiştir. Kumaşlar, deterjanlı su ve ham enzimi de içeren deterjanlı su ile ayrı ayrı

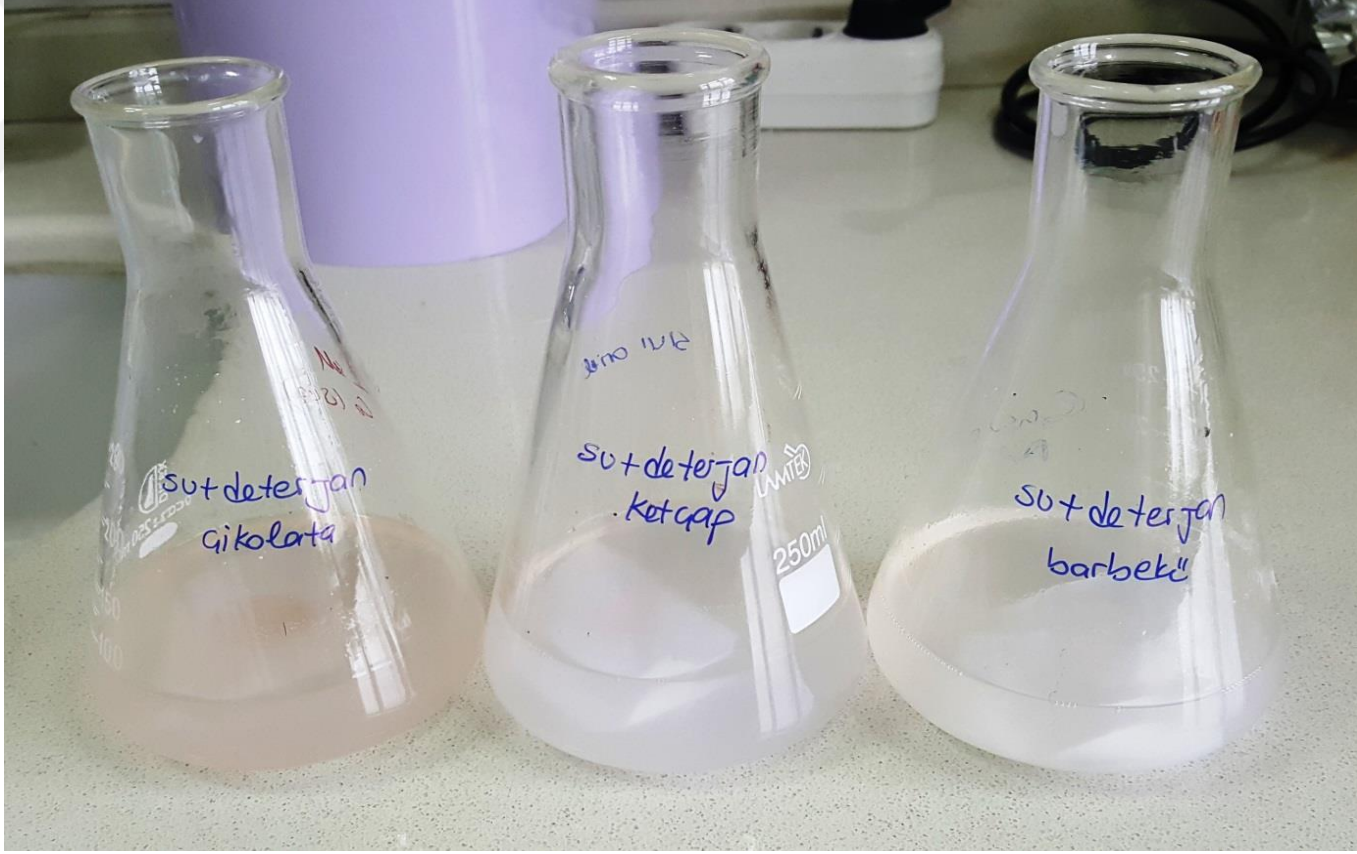
muamele edilmiş ve neticede lekelerin giderilmesinde enzim içeren yıkama çözeltisinin içermeyen yıkama çözeltisinden çok daha etkili olduğu saptanmıştır. *B. licheniformis* NH1 ham ekstraktı ile ham çilek proteazının görsel inceleme sonuçları kıyaslandığında leke gidermede çilek proteazının daha etkili olduğu söylenebilir [114].



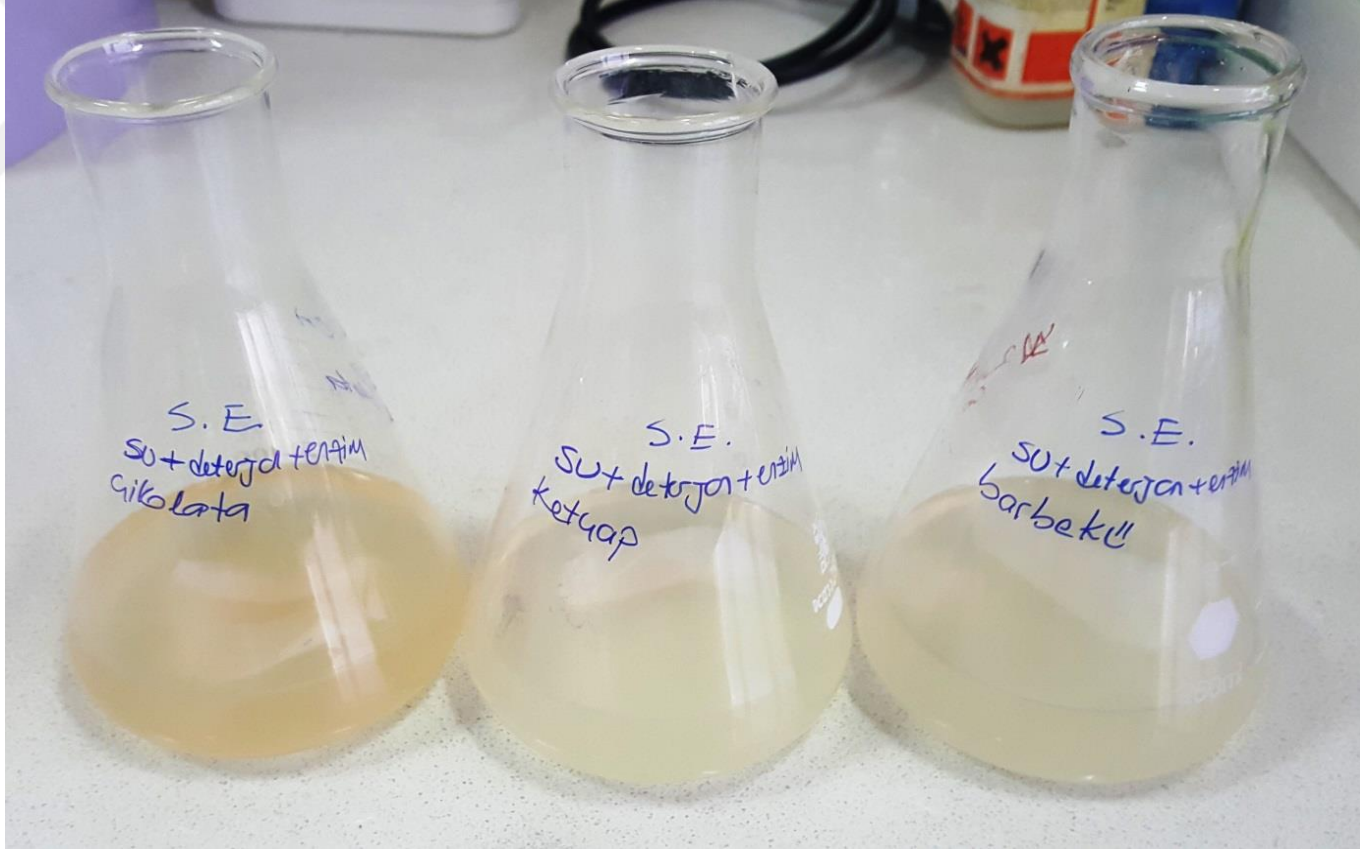
Şekil 4.28. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçaları (5 cm x 5 cm). B: barbekü sos, K:ketçap, Ç: çikolata sosu



Şekil 4.29. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçalarının çeşme suyunda yıkama sonucu



Şekil 4.30. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçalarının çeşme suyu ve deterjan karışımında yıkama sonucu



Şekil 4.31. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçalarının çeşme suyu, deterjan ve serbest proteaz karışımında yıkama sonucu



Şekil 4.32. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçalarının çeşme suyu, deterjan ve immobilize proteaz karışımında yıkama sonucu



Şekil 4.33. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçalarının çeşme suyu, deterjan ve Co^{2+} -immobilize proteaz karışımında yıkama sonucu



Şekil 4.34. Barbekü sos, ketçap ve çikolata sosu ile lekelenmiş pamuklu bez parçalarının tüm yıkama sularında yıkanıp kurutulduktan sonraki sonuçlar

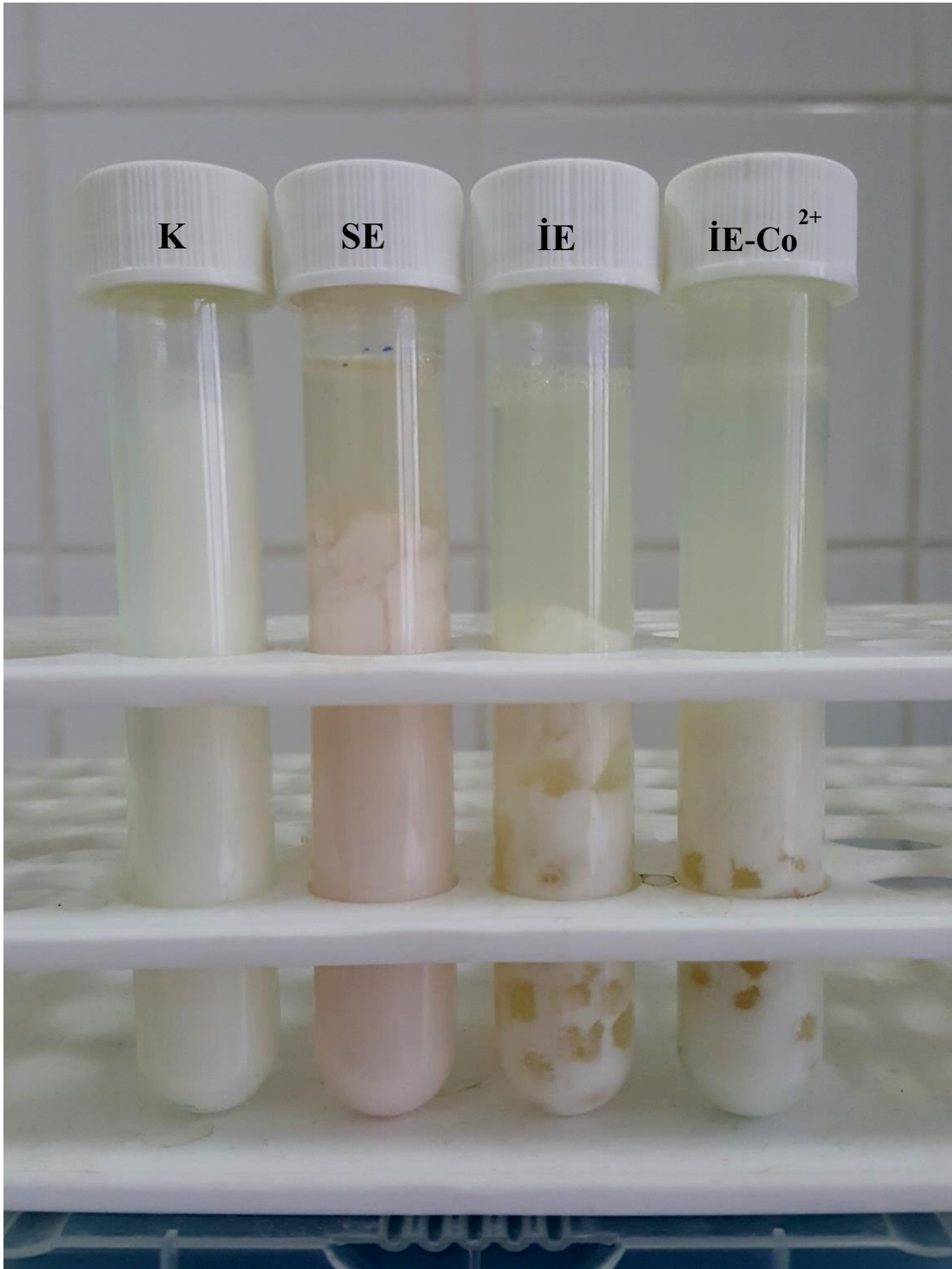
4.5.2. Çilek proteazının süt pıhtılaştırma aktivitesinin araştırılması

Bir enzim preparatı için süt pıhtılaştırma aktivitesinin (SPA) genel proteolitik aktiviteye (PA) oranı, peynir üretiminde kullanılan en önemli proteolitik enzim olan renin enziminin alternatifi olarak uygunluğunun bir göstergesidir [119]. Proteazın türü (sistein, serin, aspartik, vb.) onun spesifikliği ile büyük ölçüde ilgilidir ve gıdaların işlenmesinde kullanımını da belirleyen etmenlerden biridir. Daha yüksek bir SPA/PA oranına sahip olan bir proteaz, peynirin işlenmesi sırasında daha fazla pıhtılaşma sağlamasının yanında daha yüksek bir verim eldesi ve daha düşük düzeyde acılık oluşumu sağlar. Daha düşük bir SPA/PA oranı ise düşük düzeyde pıhtılaşma, zayıf sertlikte çökelek oluşumu ve son ürünün duyuusal özelliklerini etkileyen acı peptidlerin salınması ile sonuçlanır [120]. Bu amaçla enzimlerin süt pıhtılaştırma yetenekleri araştırılırken bu orandan faydalanılmaktadır. Çilek proteazının (serbest ve immobilize) süt pıhtılaştırma testi sonuçları Şekil 4.35.'de verilmiştir. Serbest ve immobilize çilek proteaz enzimlerinin tümü az yağlı süt örneğini pıhtılaştırmıştır ve her biri için de SPA/PA oranları hesaplanmıştır. Elde edilen ölçüm sonuçları Tablo 4.9.'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre 10 mL az yağlı sütün pıhtılaşma süresi serbest enzim için 780 s, immobilize enzim için 930 s, Co^{2+} iyonları ile birlikte immobilize edilmiş enzim için 1870 s olarak belirlenmiştir. Çilek ham enzim örnekleri için elde edilen SPA/PA oranları incelendiğinde, çilek proteazının peynir endüstrisinde süt pıhtılaştırıcı enzim alternatifi olarak kullanım potansiyelinin düşük olduğu görülmektedir. Başka enzimlerle kıyaslandığında çilek proteazının süt pıhtılaştırma süresi oldukça uzundur. Ay çekirdeğinden kısmi olarak saflaştırılan proteaz enzimi için ekstraksiyon süresinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir ve bu sürenin 13,5 - 32,5 s arasında değiştiği görülmüştür [121]. Hashim ve ark.'nın gerçekleştirdiği çalışmada, zencefilin toprakaltı gövdesinden saflaştırılmış bir proteazın 314 U/mg'lık SPA gösterdiği ve SPA/PA oranının 1653 olarak hesaplandığı bildirilmiştir [119]. Bunun yanında daha düşük süt çöktürme aktivitesine sahip başka ham enzimler de literatürde mevcuttur. Çeşitli ham bitki ekstraktlarının süt pıhtılaştırma özelliklerinin incelendiği bir çalışmada SPA/PA oranları kivi için 30, kavun için 4 ve zencefil için 21 olarak bulunmuştur [120].

Tablo 4.9. Ham çilek proteazının süt çöktürme etkisi sonuçları

	Serbest enzim*	İmmobilize enzim*	İmmobilize enzim - Co ²⁺ *
Çökme süresi (s)	780±15	930±19	1870±28
SPA** (U)	30,8±0,5	25,8±0,4	12,8±0,3
SPA** (U/mg)	3,13±0,5	4,45±0,4	4,96±0,6
PA*** (U/mg)	0,23±0,09	0,40±0,07	3,20±0,3
SPA/PA	13,61±0,2	11,11±0,4	1,55±0,1

*± değerler üçlü ölçümlerin standart sapma değerini ifade etmektedir.**SPA: Süt pıhtılaştırma aktivitesi, ***PA:Proteolitik aktivite.



Şekil 4.35. Ham çilek proteaz enziminin süt çöktürme aktivitesi sonuçları (K:kontrol, SE:serbest enzim, İE: immobilize enzim, İE-Co²⁺: immobilize enzim-Co²⁺).

BÖLÜM 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Çilek meyvesinden izole edilen proteaz enzimi, Sefaroz-4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisi sonucunda toplanan elli adet fraksiyon içerisinde iki adet fraksiyonda (37 ve 46 nolu fraksiyonlar) aktivite düzeyi yüksek, protein miktarı ise oldukça düşük olduğundan bu fraksiyonlarda proteaz enziminin saf bir şekilde elüe edildiği düşünülmüştür. Spesifik aktivite sonuçları da bu bulguları desteklemektedir. Saflaştırma işlemi art arda tekrarlanarak her defasında bu iki fraksiyon tek bir havuzda birleştirilmiştir. Saf çilek proteazının karakterize edildiği tüm çalışmalarda bu havuzdan alınan enzim seyreltilerek kullanılmıştır. Seçilen yöntemin en büyük avantajı, çilek proteaz enzimin tek adımda saflaştırılmış olmasıdır. Bununla birlikte, afinite yönteminin çok pahalı olması ve her defasında çok az miktarda enzimin saflaştırılması gibi dezavantajları da mevcuttur. Neticede, çilek meyvesinden izole edilen proteaz enzimi afinite kromatografisi ile %38,37 saflaştırma verimi ve 395,6 saflaştırma katsayısı ile başarılı bir şekilde ileri derecede saflaştırılmıştır.

Çilek proteazının saflığının kontrol edilmesi ve yaklaşık olarak molekül ağırlığının hesaplanmasında SDS-PAGE metodu kullanılmıştır. Standart protein belirteçlerinin yardımıyla enzimin molekül ağırlığı 65,8 kDa olarak hesaplanmıştır. Jelin boyanmasının ardından enzimin yüklendiği kısımda tek bir protein bandının gözlenmesi çilek proteaz enziminin tek zincirli bir yapıya sahip olduğu ve çilek ham ekstraktındaki diğer tüm proteinlerden ayrılarak başarılı bir şekilde saflaştırıldığını göstermektedir.

Saf çilek proteazının azokazein modifiye substratı ve kazein, BSA, jelatin ve hemoglobin gibi doğal protein substratları varlığındaki aktivite değerleri kıyaslanarak substrat spesifikliğı belirlenmeye çalışılmıştır. Enzimin denenen tüm substratlarla reaksiyon verdiği, en yüksek spesifikliğı hemoglobine karşı ve en düşük spesifikliğı kazeine karşı gösterdiği belirlenmiştir. Çilek proteazının substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla ayrıca p-nitroanilid ile konjuge edilmiş sentetik peptid substratlarına karşı ilgisi de test edilmiştir. Çilek proteazının denenen tüm sentetik substratlarla reaksiyon vermiş olması, farklı gruplardan hidroliz yeteneğı dolayısıyla geniş bir substrat spesifikliğıne sahip olduğunu göstermektedir. Sentetik substratlar arasında en yüksek spesifikliğın N-Suc-L-Phe-pNA ve ardından DL-BAPNA substratına karşı gözlenmesi, enzimin Phe- ve Arg- kalıntılarını hidroliz için daha yüksek spesifiklikle tercih ettiğini düşündürmektedir.

Gerçekleştirilen enzim karakterizasyon çalışmaları kapsamında saf çilek proteaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının, organik çözücülerin ve bazı spesifik inhibitörlerin etkisi ayrı ayrı incelenmiştir. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisinin incelendiğı çalışmanın sonuçları, Co^{2+} iyonları haricindeki tüm metal iyonlarının enzimi inhibe ettiğini göstermektedir. Özellikle Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} ve Mn^{2+} iyonları çilek proteaz enziminin aktivitesinin büyük kısmını kaybetmesine neden olmuştur ve hatta Cu^{2+} ve Mn^{2+} iyonları (5 mM) enzimi tamamen inhibe etmiştir. Co^{2+} iyonlarının çilek proteazı üzerindeki aktivasyon etkisi ise son derecede etkileyicidir. Co^{2+} iyonları 2 mM düzeyinde kullanıldığında enzim aktivitesini %172, 5 mM düzeyinde kullanıldığında ise %237 arttırmıştır. Burada meydana gelen büyük bir aktivasyon etkisidir.

Çalışmada test edilen tüm organik çözücülerin çilek proteazını inhibe ettiğı saptanmıştır. Denenen çözücüler içerisinde enzimin en duyarlı olduğı çözücü 2-propanoldür, enzimi tamamen inhibe etmiştir. Sonuçlara göre çilek proteazının organik çözücüler varlığındaki kararlılığının ortalama düzeyde olduğı söylenebilir.

TPCK, TLCK ve PMSF (Serin proteaz); Pepstatin A (aspartik proteaz); IAA (sistein proteaz), EDTA ve 1,10-fenantrolin (metaloproteaz) aktif bölge yönelimli inhibitörlerinin çilek proteaz aktivitesi üzerinde yarattığı inhibisyon etkileri

karşılaştırıldığında, serin proteaz inhibitörlerinin çilek proteazını kuvvetle inhibe ettiği görülmektedir. Test edilen tüm inhibitörler arasında çilek proteazı için en kuvvetli olan TPCK'dır. Bir kimotripsin-benzeri serin proteaz inhibitörü olan TPCK, 3 mM gibi düşük bir konsantrasyonda kullanıldığında bile çilek proteazını tamamen inhibe etmiştir. Metaloproteaz inhibitörlerinin (5 mM) başlangıç proteaz aktivitesini yarıya indirmesi çilek proteaz aktivitesinin metal iyonlarının varlığından hassas bir şekilde etkilendiğini göstermektedir. Bunun yanında çilek proteazının aktivite göstermek için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duymaması metaloproteaz olmadığını düşündürmektedir. Bu sonuçlar, çilek proteazının metal iyonlarına duyarlı bir serin proteaz olabileceğini ve de genel olarak aktif bölge yönelimli geri dönüşümsüz inhibitörlerin varlığından etkilendiğini göstermektedir.

Bununla birlikte, inhibisyon sonuçlarının yanında substrat spesifikliği sonuçları da çilek proteazının hangi proteaz ailesine ait olduğu hususunda bir fikre varmamıza yardımcı olmaktadır. Substrat spesifikliğine bağlı olarak serin proteazlar, tripsin-benzeri, kimotripsin-benzeri ve elastaz-benzeri olarak üç gruba ayrılabilirler. Tripsin yapısındaki spesifiklik cebi negatif yüklü bir aspartik asit kalıntısına sahiptir, bu nedenle tripsin ile parçalanan substratlar uygun pozisyonda lizin ya da arginin gibi pozitif yüklü bir amino asit içermelidir. Elastaz enziminde bu cep çok küçüktür, bu nedenle sadece glisin veya alanin gibi nispeten küçük amino asit yan zincirleri olan proteinler bu enzim tarafından parçalanabilir. Öte yandan, kimotripsinde spesifiklik cebi hidrofobik amino asitlerle kaplanmıştır ve bu nedenle lösin veya izolösin gibi hidrofobik amino asitleri olan substrat proteinleri katalitik triadın aktivite göstermesi için sıkı bir şekilde ve doğru yönde bağlanır [122]. Spesifiklik çalışmasında, bu kalıntılara sahip olan peptidler kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmeye çalışılmıştır. Çilek proteazının sentetik substratlarla gösterdiği aktivite değerleri karşılaştırıldığında, -Phe ve daha sonra -Arg kalıntılarına daha yüksek afinite gösterdiği görüldüğünden, kesin bir sonuca varmak mümkün olmasa bile, çilek proteazının tripsin-benzeri ya da kimotripsin-benzeri serin proteaz olabileceği düşünülmektedir. Spesifik bir kimotripsin-benzeri serin proteaz inhibitörü olan TPCK'nın çilek proteazını tamamen inhibe etmesi ise enzimin bir kimotripsin-benzeri serin proteaz olabileceği iddiasını güçlendirmektedir.

Gerçekleştirilen immobilizasyon işleminde daha kararlı Ca-aljinat kürecikleri elde etmek adına, immobilizasyon koşulları optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, Na-aljinat konsantrasyonu, CaCl_2 çözeltisi konsantrasyonu, enzim çözeltisi konsantrasyonu ve reaksiyonda kullanılan kürecik miktarı değiştirilerek her bir parametre için optimum değerler belirlenmiştir. Optimum değerlerin belirlenmesinde immobilize enzimlerin spesifik aktivite değerleri izlenmiştir. Sonuçta, gerçekleştirilen immobilizasyon işlemlerinde aljinat konsantrasyonu %2, CaCl_2 çözeltisi konsantrasyonu %3, enzim çözeltisi seyrelme faktörü dört ($\text{SF}=4$) ve reaksiyonda kullanılan kürecik miktarı 0,4 g değerlerinde sabit tutulmuştur. Bu şekilde, küreciklerin gözenek boyutunun substrat ve ürünün difüzyonuna izin verecek fakat enzimin dışarıya sızmasına engel olacak büyüklükte ayarlanabilmesi amacıyla, immobilizasyon işlemi her bileşen için optimum değerlerde çalışarak gerçekleştirilmiştir.

Co^{2+} iyonlarının çilek proteazı üzerindeki kuvvetli stimülasyon etkisi, bu iyonları immobilizasyonda kullanarak immobilize enzimin etkinliğinin artırılması fikrini doğurmuştur. Immobilize edilen enzimin hem az miktarda kullanılıp hem de yüksek etkinlik sergiliyor olması bu enzimin endüstriyel işlemlerde tercih edilme olasılığını arttıracaktır. Bu düşünceden hareketle, çilek proteazının immobilizasyonu esnasında ortama Co^{2+} iyonları eklenmiş (1, 2 ve 5 mM) ve Co^{2+} iyonları da enzimle beraber oluşan küreciklerde immobilize edilmiştir. Beklendiği gibi, enzimle beraber immobilize edilen Co^{2+} iyonlarının enzim etkinliğini önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır. En yüksek aktivatör etki Co^{2+} iyonları 1 mM düzeyinde kullanıldığında gözlemlendiğinden, ileriki çalışmalarda Co^{2+} iyonu konsantrasyonu 1 mM'da sabit tutulmuştur.

Ham çilek proteazının Ca-aljinat küreciklerde immobilizasyonunun başarısının değerlendirilmesi amacıyla verim, etkinlik ve aktivite geri kazanımı değerleri hesaplanmıştır. Immobilizasyon verimi sadece ham enzim küreciklerde immobilize edildiğinde %65, ham enzim Co^{2+} iyonları ile birlikte immobilize edildiğinde ise %69 olarak bulunmuştur. Immobilizasyon etkinliği immobilize ham proteaz için %63 iken, Co^{2+} iyonlarının da ham proteaz ile immobilizasyonu ile %89'a

yükselmiştir. Verim ve etkinlik hesaplamalarına benzer şekilde, Co^{2+} iyonlarının ham çilek proteazı ile immobilizasyonu ile birlikte aktivite geri kazanımı da %41'den %61'e yükselmiştir. Co^{2+} iyonları çilek proteazını aktive ettiğinden; verim, etkinlik ve aktivite geri kazanımı değerleri Co^{2+} iyonları varlığında artmıştır. Dolayısıyla, immobilizasyon işlemi ile birlikte ham çilek proteazının aktivitesinde belirgin bir azalma meydana gelmiş olsa bile, Co^{2+} iyonlarının da enzimle birlikte immobilize edilmesiyle bu aktivite düşüşünün önemli ölçüde minimize edildiği gözlenmektedir. Co^{2+} iyonları, 1 mM gibi düşük bir konsantrasyonda kullanıldığında dahi enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırdığından immobilizasyon işleminin başarısını da beklenen doğrultuda arttırmıştır.

Saf çilek proteazının optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 6 ve 40 °C olarak bulunmuştur. Immobilizasyon sonucunda enzimin optimum sıcaklık değeri değişmezken, optimum pH değerinin 6'dan 7'ye kaydığı görülmüştür. Geniş bir pH aralığında aktivite gösteren çilek proteazının immobilize edilmesinin ardından asidik ve bazik pH'lardaki duyarlılığının arttığı belirlenmiştir. Ortam pH'ına karşı enzimin sergilediği bu davranış değişikliklerine, taşıyıcı yüzeyindeki ve immobilize enzimin mikro ortamındaki iyonlaşabilir grupların neden olmuş olabileceği düşünülmektedir. Kararlılık çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre geniş bir pH ve sıcaklık aralığında çilek proteazının kararlılığı oldukça yüksektir. Immobilizasyon işlemi enzim kararlılığını büyük ölçüde etkileyebilmektedir; immobilizasyon sonucunda enzimlerin kararlılığı artabilir veya azalabilir. Immobilize çilek proteazının pH kararlılığı sonuçları ile serbest proteaz için belirlenen pH kararlılığı sonuçları kıyaslandığında, tüm pH değerlerinde kararlılığın serbest enzime göre arttığı belirlenmiştir. Çilek proteazının immobilizasyonu neticesinde pH kararlılığında olduğu gibi termal kararlılığında da önemli bir artış gerçekleşmiştir. Özellikle ilgili sıcaklık değerlerindeki daha uzun inkübasyon süreleriyle birlikte kararlılıktaki bu artış daha da belirgin hale gelmiştir. Sonuç olarak immobilizasyon işleminin enzimin kararlılığını belirgin şekilde arttırdığı rahatlıkla söylenebilir ve bu durum enzimin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmesi açısından büyük bir avantajdır.

İmmobilize ham proteaz enziminin BSA substratı için kinetik sabitlerinin (K_m , V_{max}) belirlenmesi amacıyla Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri oluşturulmuştur. İmmobilizasyon sonucunda kinetik sabitlerin değişiminin doğru bir şekilde belirlenebilmesi amacıyla serbest ham enzimin de aynı koşullar altında K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Neticede enzimin V_{max} değerinde yok denebilecek kadar küçük bir azalma ve K_m değerinde belirgin bir artış meydana gelmiştir. Enzimin substratına afinitesinde meydana gelen bu azalma, küreciklerdeki diffüzyon problemlerinden kaynaklanıyor olabilir.

Ekonomik gerekçelerle, endüstriyel uygulamalarda kullanılma potansiyeline sahip enzimlerin tekrar kullanılabilirliğinin kontrol edilmesi gerektiğinden, bu çalışmada da immobilize çilek proteazının art arda kullanımları sonucundaki aktivite azalması incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar immobilize çilek proteazının tekrar kullanılabilirlik özelliğinin ortalama düzeyde kaldığını göstermektedir. İmmobilize enzim altı kez peş peşe kullanımının ardından aktivitesinin ancak %17,3'ünü koruyabilmiştir. Bu durum, tekrar kullanım sayısının artışı ile beraber taşıyıcı küreciklerin gözeneklerinden muhtemel enzim kaçışından kaynaklanıyor olabilir.

Tekrar kullanılabilirliğin yanında immobilize enzim preparatlarının depolanma süresince aktivitelerini ne ölçüde koruyabildikleri de endüstriyel işlemler açısından önemli bir konudur. Bu doğrultuda, immobilize ham çilek proteazının 4 ve 25 °C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta sekiz hafta boyunca depolanması sonucunda aktivitesinde meydana gelen değişim kaydedilmiştir. İmmobilizasyon işleminin enzimin kararlılığını nasıl etkilediğini anlamak için buradan elde edilen sonuçlar serbest enzimin aynı koşullardaki kararlılık ölçüm sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, hem serbest hem de immobilize enzimin 4 °C'de 25 °C'ye göre daha kararlı olduğu ve immobilizasyon işleminin her iki depolanma sıcaklığında da enzimin kararlılığını belirgin şekilde arttırdığı belirlenmiştir.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada çilek proteazının karakterizasyonu ve immobilizasyonunun ardından, immobilize enzimin deterjan katkı maddesi olarak ve süt pıhtılaştırıcı ajan olarak kullanımı gibi uygulamaları da denenmiştir.

Çilek proteazının (serbest ve immobilize) deterjan katkı maddesi olarak kullanım potansiyeli birkaç farklı adımdan oluşan bir prosedürle araştırılmıştır. İlk aşamada enzim deterjan formülasyonunda mevcut olabilecek yüzey aktif maddelerle ve oksitleyici maddelerle etkileştirilerek aktivite değişimi izlenmiştir. Sonraki aşamada enzim doğrudan çeşitli katı ve sıvı ticari deterjanlarla etkileştirilerek aktivitesindeki değişim incelenmiştir. Son aşamada ise enzimin yıkama performansı test edilmiştir.

Çilek proteazının test edilen yüzey aktif maddelerin tümüyle birlikte büyük bir uyumluluk içerisinde çalıştığı ve bu maddelerin varlığında oldukça kararlı olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, çilek proteazının bir oksitleyici ajan olan sodyum perborat varlığındaki kararlılığı oldukça yüksektir ve immobilizasyonla birlikte enzim sodyum perborat varlığından hiç etkilenmemektedir. Hidrojen peroksit ile elde edilen sonuçlar ise daha farklıdır. Hidrojen peroksit varlığında tüm enzim örnekleri için aktivite neredeyse yarıya inmiştir. Deterjan bileşenleri arasında çilek proteazının en fazla duyarlılık gösterdiği ajan hidrojen peroksittir.

İkinci aşamada kullanılan katı ve sıvı ticari deterjanlara karşı da çilek proteazı oldukça yüksek bir kararlılık sergilemiştir. Test edilen tüm katı deterjanların çilek proteazını düşük düzeyde inhibe ettiği belirlenmiştir. Sıvı deterjanlar (G hariç) serbest enzimi düşük düzeyde inhibe ederken, sıvı deterjan varlığında immobilize enzimlerde aktivasyon görülmüştür. Bu durum deterjan formülasyonlarındaki bazı katkı maddelerinin çilek proteazı için aktivatör görevi görebileceğini düşündürmektedir. Sonuçta, çilek proteazının ticari deterjanlar varlığında yüksek bir kararlılık sergilediği saptanmıştır.

Her üç aşamada da immobilizasyonla serbest enzime göre halihazırda yüksek olan kararlılığın az da olsa arttığı görülmüştür. Bunun da ötesinde, Co^{2+} iyonlarının çilek proteazı üzerindeki stimülasyon etkisinin sonucu olarak, yüzey aktif maddelerin enzim üzerinde yarattığı düşük düzeydeki inaktivasyonun iyice minimize edildiği saptanmıştır.

Son aşamada çilek proteazının yıkama performansı ketçap, çikolata sosu ve barbekü sosu lekelerinin pamuklu kumaşlardan temizlenmesi yoluyla test edilmiştir. Bu kumaşlar musluk suyu, deterjanlı musluk suyu ve enzim ilaveli deterjanlı musluk suyunda ayrı ayrı yıkanmış, durulanmış ve kurutulmuştur. Elde edilen sonuçlar, çilek ham enziminin ketçap, çikolata ve barbekü sosu gibi zor lekeleri etkili bir şekilde temizleyebildiğini göstermektedir. Yıkanan kumaşların görsel olarak incelenmesi neticesinde çilek proteazının kullanılan deterjanın leke çıkarma performansını belirgin şekilde arttırdığı görülmektedir. Çilek proteazının yüksek kararlılığı ve etkin yıkama performansı, deterjan sanayiinde yüksek bir kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Çilek proteazı ayrıca süt pıhtılaştırma özelliği açısından da test edilmiştir. Serbest ve immobilize çilek proteaz enzimlerinin tümü az yağlı süt örneğini pıhtılaştırmıştır ancak her biri için ölçülen süt pıhtılaştırma süresi oldukça uzundur.

Bir serin proteaz olduğu düşünülen çilek proteazının deterjan katkı maddesi olarak kullanımı ile ilgili çok güzel sonuçlar elde edilmiş olsa da peynir endüstrisinde süt pıhtılaştırıcı enzim alternatifi olarak kullanım potansiyelinin düşük olduğu görünmektedir.

Sonuç olarak, proteaz enziminin çilek meyvesinden saflaştırılması, karakterizasyonu, immobilizasyonu ve farklı uygulama alanlarının araştırılması şeklindeki her bir adım başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Çilek, proteaz enzim kaynağı olarak ilk defa bizim çalışmamızda kullanılmıştır. Çilek meyvesi ülkemizin birçok yerinde yaygın olarak tüketilen bir besin olduğundan, proteaz enzim kaynağı olarak literatüre kazandırılması önemlidir.

5.2. Öneriler

Tez çalışmamız kapsamında tamamlanan karakterizasyon çalışmaları çilek proteazının iyi bir deterjan katkı maddesi olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir. Enzimin birçok farklı parametre ile belirlenmiş yüksek kararlılık özelliği düşünülürse, proteaz enzimlerinin kullanıldığı farklı endüstri dallarındaki uygulamalarının araştırılması da oldukça yerinde olacaktır. Bu amaçla çilek proteazının kıl giderimi, peptid sentezi, X-ray ve fotoğraf filmlerinden gümüşün geri kazanılması, tekstil endüstrisinde kullanılan doğal liflerin esnekliğinin ve temizliğinin sağlanması ve atık işleme gibi uygulamaları ileriye yönelik çalışmalar olarak düşünülebilir. Ayrıca çilek proteazının immobilizasyonunda farklı metodlar ve farklı taşıyıcıların denenmesi de, aktivitesi ve tekrar kullanılabilirlik özelliği daha yüksek bir immobilize enzim preparatı oluşturulması açısından faydalı olabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Sharma, K.M., Kumar, R., Panwar, S., Kumar, A., Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. J. Genet. Eng. Biotechnol., 15, 115–126, 2017.
- [2] Shamsi, T.N., Parveen, R., Fatima, S., Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. Int. J. Biol. Macromol., 91, 1120–1133, 2016.
- [3] Chute, M., Jana, S., Kassiri, Z., Disintegrin and metalloproteinases (ADAMs and ADAM-TSs), the emerging family of proteases in heart physiology and pathology. Curr. Opin Physiol., 01, 34–45, 2018.
- [4] Harish, B.S., Uppuluri, K.B., Microbial serine protease inhibitors and their therapeutic applications. Int. J. Biol. Macromol., 107, 1373–1387, 2018.
- [5] Hua, Y., Nair, S., Proteases in cardiometabolic diseases: Pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. Biochim. Biophys. Acta, 852, 195–208, 2015.
- [6] González-Rábade, N., Badillo-Corona, J.A., Aranda-Barradas, J.S., Oliver-Salvador, M.C., Production of plant proteases in vivo and in vitro — A review. Biotechnol. Adv., 29, 983–996, 2011.
- [7] Sun, Q., Zhang, B., Yan, Q.J., Jiang, Z.Q., Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. Food Chem., 213, 708–713, 2016.
- [8] Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 597–635, 1998.
- [9] Petinate, S.D.G., Branquinha, M.H., Coelho, R.R.R., Vermelho, A.B., Giovanni-De-Simone, S., Purification and partial characterization of an extracellular serine-proteinase of *Streptomyces cyaneus* isolated from Brazilian cerrado soil. J. Appl. Microbiol., 87, 557–563, 1999.

- [10] Patel, G.K., Kawale, A.A., Sharma, A.K., Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta*. Plant. Physiol. Biochem., 52, 104-111, 2012.
- [11] Chanda, I., Basu, S.K., Dutta, S.K., Das, S.R.C., A protease isolated from the latex of *Plumeria rubra* Linn (*Apocynaceae*) 1: Purification and Characterization. Trop. J. Pharm. Res., 10(6), 705-711, 2011.
- [12] Sharma, A., Kumari, M., Jagannadham, M.V., Religiosin C, a cucumisin-like serine protease from *Ficus religiosa*. Process Biochem., 47, 914-921, 2012.
- [13] Mazorra-Manzano, M.A., Moreno-Hernández, J.M., Ramírez-Suarez, J.C., Torres-Llanez, M.J., González-Córdova, A.F., Vallejo-Córdova, B., Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. LWT-Food Sci .Technol., 54, 325-330, 2013.
- [14] Wang, S., Deng, Z., Li, Q., Ge, X., Bo, Q., Liu, J., Cui, J., Jiang, X., Liu, J., Zhang, L., Hong, M., A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, *Neanthes japonica*. Comp. Biochem. Physiol., 159, 18-25, 2011.
- [15] Khaled, H.B., Ghorbel-Bellaaj, O., Hmidet, N., Jellouli, K., Ali, N.E.H., Ghorbel, S., Nasri, M., A novel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (*Sardinella aurita*): purification and characterisation. Food Chem., 128, 847-853, 2011.
- [16] Hahn, B.S., Cho, S.Y., Ahn, M.Y., Kim, Y.S., Purification and characterization of a plasmin-like protease from *Tenodera sinensis* (Chinese mantis). Insect Biochem. Mol. Biol., 31, 573-581, 2001.
- [17] Takeuchi, K., Yokosawa, H., Hoshi, M., Purification and characterization of hatching enzyme of *Strongylocentrotus intermedius*. Eur. J. Biochem., 100, 257-265, 1979.
- [18] Annamalaia, N., Rajeswarib, M.V., Balasubramanianb T., Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes. Food Bioprod. Process., 92, 335-342, 2014.
- [19] Asker, M.M.S., Mahmoud, M.G., Shebwy, K.E., Aziz, M.S.AE., Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. J. Genetic Eng. Biotechnol., 11, 103-109, 2013.

- [20] Anbu, P., Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). *Int. J. Biol. Macromol.*, 56, 162– 168, 2013.
- [21] Sinha, R., Khare, S.K., Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: differential role of metal ions in stability and activity. *Bioresour. Technol.*, 145, 357–361, 2013.
- [22] Anitha, T.S., Palanivelu, P., Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Expr. Purif.*, 88, 214–220, 2013.
- [23] Cavello, I.A., Hours, R.A., Rojas, N.L., Cavalitto, S.F., Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. *Process Biochem.*, 48, 972–978, 2013.
- [24] van der Hoorn, R.A.L., Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 191–223, 2008.
- [25] Heutinck, K.M., ten Berge, I.J.M., Hack, C.E., Hamann, J., Rowshani, A.T., Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol. Immunol.*, 47, 1943–1955, 2010.
- [26] Vojcic, L., Pitzler, C., Körfer, G., Jakob, F., Martinez, R., Maurer, K.H., Schwaneberg, U., Advances in protease engineering for laundry detergents. *N. Biotechnol.*, 32(6), 629–634, 2015.
- [27] Rani, K., Rana, R., Datt, S., Review on latest overview of proteases. *Int. J. Curr. Life Sci.*, 2(1), 12 – 18, 2012.
- [28] Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I., del Río, L.A., Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 521–530, 2002.
- [29] dos Santos Aguilar, J.G., Sato, H.H., Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Res. Int.*, 103, 253–262, 2018.
- [30] Siklos, M., BenAissa, M., Thatcher, G.R.J., Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm. Sin. B*, 5(6), 506–519, 2015.
- [31] Almonte, A.G., Sweatt, J.D., Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: Roles in synaptic function and behavior. *Brain Res.*, 1407, 107–122, 2011.

- [32] Voigt, G., Biehl, B., Heinrichs, H., Voigt, J., Aspartic proteinase levels in seeds of different angiosperms. *Phytochemistry*, 44, 389–392, 1997.
- [33] Hiraiwa, N., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I., An aspartic endopeptidase is involved in the breakdown of propeptides of storage proteins in protein-storage vacuoles of plants. *Eur. J. Biochem.*, 246, 133–141, 1997.
- [34] Bethke, P.C., Hillmer, S., Jones, R.J., Isolation of intact protein storage vacuoles from barley aleurone. Identification of aspartic and cysteine proteases. *Plant Physiol.*, 110, 521–529, 1996.
- [35] Marttila, S., Jones, B.L., Mikkonen, A., Differential localization of two acid proteinases in germinating barley (*Hordeum vulgare*) seeds. *Physiol. Plant.*, 93, 317–327, 1995.
- [36] Schaller, A., Ryan, C.A., Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein. *Plant Mol. Biol.*, 31, 1073–1077, 1996.
- [37] Cordeiro, M.C., Xue, Z.T., Pietrzak, M., Paris, M.S., Brodelius, P.E. 1995. Plant aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* ssp. *flavescens* cv. Cardoon; nucleotide sequence of a cDNA encoding cyprosin and its organ-specific expression. In: *Aspartic Proteinases*, Plenum, New York, 367–372.
- [38] Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Faro, C., Pires, E., Action of bovine α S1-casein of cardosins A and B, aspartic proteinases from the flowers of the cardoon *Cynara cardunculus* L. *Biochim. Biophys. Acta*, 1297, 83–89, 1996.
- [39] Runeberg-Roos, P., Törmäkangas, K., Ötsman, A., Primary structure of a barley-grain aspartic proteinase: a plant aspartic proteinase resembling mammalian cathepsin D. *Eur. J. Biochem.*, 202, 1021–1027, 1991.
- [40] Erez, E., Fass, D., Bibi, E., How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature*, 459, 371–378, 2009.
- [41] Liu, Z. 2012. Inhibitory mechanisms of peptides and antibodies targeting murine urokinase-type plasminogen activator. University of Aarhus, Danish-Chinese Centre for Proteases and Cancer, Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO), Ph.D. Dissertation.
- [42] Mehrtens, J.M. 2007. The design, synthesis and biological assay of cysteine protease specific inhibitors. University of Canterbury, Chemistry Department, Ph.D. Dissertation.

- [43] Theron, L. 2017. Investigating the impact of MpAPr1, an aspartic protease from the yeast *Metschnikowia pulcherrima*, on wine properties. Université de Bordeaux, Food engineering, Ph.D. Dissertation.
- [44] Auld, D.S. 2013. Catalytic mechanisms for metallopeptidases. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, Elsevier, Boston, 370–396.
- [45] Shah, M.A., Mir, S.A., Paray, M.A., Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. Dairy Sci. Technol., 94, 5–16, 2014.
- [46] Ehren, J., Móron, B., Martin, E., Bethune, M.T., Gray, G.M., Khosla, C., A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. PLoS One, 4(7), 1-10, 2009.
- [47] Shakilanishi, S., Shanthi, C., Specificity studies on proteases for dehairing in leather processing using decorin as model conjugated protein. Int. J. Biol. Macromol., 103, 1069–1076, 2017.
- [48] Gurumalles, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., Muthusamy, S., A systematic reconsideration on proteases. Int. J. Biol. Macromol., 128, 254–267, 2019.
- [49] Ali, S., Zafar, W., Shafiq, S., Manzoor, M., Enzymes immobilization: an overview of techniques, support materials and its applications. Int. J. Sci. Technol. Res., 6(7), 64-72, 2017.
- [50] Tavano, O.L., Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. J. Mol. Catal. B Enzym., 90, 1– 11, 2013.
- [51] Dwevedi, A. 2016. Basics of enzyme immobilization. In: Enzyme Immobilization, Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment, Springer International Publishing Switzerland, 21–44.
- [52] Etcı, K. 2011. Sol-jel tekniğine göre manyetik nanopartiküllere lipaz immobilizasyonu ve bazı enantiyoseçimli tepkimelerde kullanılması. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- [53] Datta, S., Rene, C.L., Rajaram, Y.R.S., Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. 3 Biotech., 3(1), 1-9, 2013.
- [54] Tercan, Ç. 2011. Immobilization of thermophilic recombinant esterase enzyme by microencapsulation in alginate-chitosan/CaCl₂ polyelectrolyte beads. Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology, Master's Thesis.

- [55] Tonnesen, H.H., Karlsen, J., Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 28, 621–630, 2002.
- [56] Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D., Biological interactions between polysaccharides and divalent cations - egg-box model. *FEBS Lett.*, 32, 195–198, 1973.
- [57] Lee, K.Y., Mooney, D.J., Alginate: properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.*, 37(1), 106–126, 2012.
- [58] Mohamad, N.R., Marzuki, N.H.C., Buang, N.A., Huyop, F., Wahab, R.A., An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 29, 205-220 , 2015.
- [59] Kasavi, C. 2006. Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorpsiyon metotları ile proteaz enziminin immobilizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- [60] Guisan, J.M. 2006. Immobilization of enzymes as the 21st century begins. In: *Immobilization of enzymes and cells*, Humana Press Inc., New Jersey (NJ), 1-13.
- [61] Sheldon, R.A., Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. *Biochem. Soc.*, 35 (6), 1583-1587, 2007.
- [62] Hanefield, U., Gardossi, L., Magner, E., Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.*, 38, 453-468, 2008.
- [63] Krishnamoorthi, S., Banerjee, A., Roychoudhury, A., Immobilized enzyme technology: potentiality and prospects. *J. Enzymol. Metabol.*, 1(1), 104, 2015.
- [64] Brena, B.M., Batista-Viera, F. 2006. Immobilization of enzymes. In: *Immobilization of enzymes and cells*, Humana Press Inc., New Jersey (NJ), 123-124.
- [65] Kotecha, P.M., Madhavi, D.L. 1995. Berries. In: *Handbook of Fruit Science and Technology. Production, Composition, Storage, and Processing*. Marcel Dekker, Inc., New York, 315-334.
- [66] Muthukumaran, S., Tranchant, C., Shi, J., Ye, X., Xue, S.J., Ellagic acid in strawberry (*Fragaria* spp.): Biological, technological, stability, and human health aspects. *Food Quality and Safety*, 1(4), 227–252, 2017.

- [67] Cordenunsi, B.R., Oliveira Do Nascimento, J.R., Genovese, M.I., Lajolo, F.M., Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2581-2586, 2002.
- [68] Ornelas-Paz, J.J., Yahia, E.M., Ramirez-Bustamante, N., Perez-Martinez, J.D., del Pilar Escalante-Minakata, M., Ibarra-Junquera, V., Muniz, C.A., Guerrero-Prieto, V., Ochoa-Reyes, E., Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chem.*, 138, 372–381, 2013.
- [69] Öztürk Sarıkaya, S.B. 2006. Yabani çuha (*Primula veris*) bitkisinin çiçeklerinden proteaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve peynir üretiminde kullanılabilirliğinin araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- [70] Takami, H., Akiba, T., Horikoshi, K., Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 120-124, 1989.
- [71] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254, 1976.
- [72] Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685, 1970.
- [73] Lineweaver, H., Burk, D., The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658–661, 1934.
- [74] Sheldon, R.A., van Pelt, S., Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.*, 42, 6223-6235, 2013.
- [75] Arima, K., Yu, J., Iwasaki, S. 1970. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, New York, 446–459.
- [76] Yildirim, V., Baltaci, M.O., Ozgencli, I., Sisecioglu, M., Adiguzel, A., Adiguzel, G., Purification and biochemical characterization of a novel thermostable serine alkaline protease from *Aeribacillus pallidus* C10: a potential additive for detergents. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 32(1), 468–477, 2017.
- [77] Mothe, T., Sultanpuram, V.R., Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinilyticus*. *3 Biotech.*, 6(53), 1–10, 2016.

- [78] Singh, K.A., Kumar, R., Rao, G.R.K., Jagannadham, M.V., Crinum, a chymotrypsin-like but glycosylated serine protease from *Crinum asiaticum*: purification and physicochemical characterization. Food Chem., 119, 1352–1358, 2010.
- [79] Dornelles, L.P., Souza, M.F.D., Silva, P.M., Procópio, T.F., Filho, R.S.R., Lima, T.A., Oliveira, A.P.S., Zingali, R.B., Paiva, P.M.G., Pontual, E.V., Napoleão, T.H., Purification and characterization of a protease from the visceral mass of *Mytella charruana* and its evaluation to obtain antimicrobial peptides. Food Chem., 245, 1169–1175, 2018.
- [80] Wang, R., Liu, S., Wang, J., Dong, Q., Xu, L., Rui, Q., Purification, characterization and identification of a senescence related serine protease in dark-induced senescent wheat leaves. Phytochemistry, 95, 118–126, 2013.
- [81] Ferreira, J.F., Santana, J.C.C., Tambourgi, E.B., The effect of pH on bromelain partition from *Ananas comosus* by PEG4000/phosphate ATPS. Braz. Arch. Biol. Technol., 54, 125–132, 2011.
- [82] Serge, N.E., Blandine, M.K.L., Kumar, S., Clergé, T., Vijayalakshmi, M., Extraction, purification, and biochemical characterization of serine protease from leaves of *Abrus precatorius*. Prep. Biochem. Biotechnol., 47(10), 1016–1024, 2017.
- [83] Tomar, R., Kumar, R., Jagannadham, M.V., A stable serine protease, Wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. J. Agric. Food Chem., 56, 1479–1487, 2008.
- [84] Aissaoui, N., Chobert, J.M., Haertlé, T., Marzouki, M.N., Abidi, F., Purification and biochemical characterization of a neutral serine protease from *Trichoderma harzianum*. Use in antibacterial peptide production from a fish by-product hydrolysate. Appl. Biochem. Biotechnol., 182, 831–845, 2017.
- [85] Hemici, A., Benerbaiha, R.S., Bendjeddou, D., Purification and biochemical characterization of a 22-kDa stable cysteine-like protease from the excretory-secretory product of the liver fluke *Fasciola hepatica* by using conventional techniques. J. Chromatogr. B, 1068–1069, 268–276, 2017.
- [86] Silva, R.R., Oliveira, L.C.G., Juliano, M.A., Juliano, L., Oliveira, A.H.C., Rosa, J.C., Cabral, H., Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Food Chem., 225, 45–54, 2017.

- [87] Enling, H., Tao, X., Zhaohui, Z., Xiangzhao, M., Purification and characterization of an alkaline protease from *Micrococcus* sp. isolated from the South China Sea. *J. Ocean Univ. China*, 16(2), 319–325, 2017.
- [88] Suwannaphan, S., Fufeungsombut, E., Promboon, A., Chim-anage, P., A serine protease from newly isolated *Bacillus* sp. for efficient silk degumming, sericin degrading and colour bleaching activities. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 117, 141–149, 2017.
- [89] Yadav, S.K., Bisht, D., Tiwari, S., Darmwal, N.S., Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 4, 667–677, 2015.
- [90] Kamran, A., Rehman, H.U., Qader, S.A.U., Baloch, A.H., Kamal, M., Purification and characterization of thiol dependent, oxidation-stable serine alkaline protease from thermophilic *Bacillus* sp. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 13, 59–64, 2015.
- [91] Salihi, A., Asoodeh, A., Aliabadian, M., Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *Int. J. Biol. Macromol.*, 94, 827–835, 2017.
- [92] Dey, G., Singh, B., Banerjee, R., Immobilization of α -amylase produced by *Bacillus circulans* GRS 313. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 46(2), 167–176, 2003.
- [93] Farag, A.M., Hassan, M.A., Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microbial. Technol.*, 34, 85-93, 2004.
- [94] Doumèche, B., Heinemann, M., Büchs, J., Hartmeier, W., Ansorge-Schumacher, M.B., Enzymatic catalysis of gel-stabilized two-phase systems: improvement of the solvent phase. *J. Mol. Catalysis B. Enz.*, 18, 19-27, 2002.
- [95] Elibol, M., Moreira, A.R., Production of, extracellular alkaline protease by immobilization of the marine bacterium *Teredinobacter turnirae*. *Process Biochem.*, 38, 1445-1450, 2003.
- [96] Anwar, A., Ul Qader, S.A., Raiz, A., Iqbal, S., Azhar, A., Calcium alginate: a support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. *World Appl. Sci.*, 7(10), 1281-1286, 2009.
- [97] Mittal, A., Khurana, S., Singh, H., Kamboj, R.C., Characterization of dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) immobilized in Ca alginate beads. *Enzyme Microb. Technol.*, 37, 318–323, 2005.

- [98] Quiroga, E., Illanes, C.O., Ochoa, N.A., Barberis, S., Performance improvement of araujiain, a cystein phytoprotease, by immobilization within calcium alginate beads. *Process Biochem.*, 46, 1029–1034, 2011.
- [99] Parrish, R.F., Polakoski, K.L., Stimulation of proteolytic activity of boar sperm acrosin by divalent metal ions. *J. Reprod. Fertil.*, 62(2), 417-22, 1981.
- [100] Narwal, R.K., Bhushan, B., Pal, A., Malhotra, S.P., Kumar, S., Saharan, V., Inactivation thermodynamics and iso-kinetic profiling for evaluating operational suitability of milk clotting enzyme immobilized in composite polymer matrix. *Int. J. Biol. Macromol.*, 91, 317–328, 2016.
- [101] Abdel-Naby, M.A., Ismail, A.M.S., Ahmed, S.A., Abdel Fattah, A.F., Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. *Bioresource Technol.*, 64, 205-210, 1998.
- [102] Norouzian, D., Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology. *Iran. J. Biotechnol.*, 1(4), 197-206, 2003.
- [103] Marathe, S.K., Vashistht, M.A., Prashanth, A., Parveen, N., Chakraborty, S., Nair, S.S., Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. *Genet. Eng. Biotechnol. J.*, 16 (1), 39-46, 2018.
- [104] Chaplin, M.F., Bucke, C. 1990. The preparation and kinetics of immobilised enzymes. In: *Enzyme Technology*, Cambridge University Press, New York, 80–136.
- [105] Sharma, N., Tripathi, S., Kinetic study of free and immobilized protease from *Aspergillus* sp. *J. Pharm. Biol. Sci.*, 7(2), 86-96, 2013.
- [106] Sahu, A., Badhe, P.S., Adivarekar, R., Ladole, M.R., Pandit, A.B., Synthesis of glycinamides using protease immobilized magnetic nanoparticles. *Biotechnol. Rep.*, 12, 13–25, 2016.
- [107] Ibrahim, A.S.S., Al-Salamah, A.A., El-Toni, A.M., Almaary, K.S., El-Tayeb, M.A., Elbadawi, Y.B., Antranikian, G., Enhancement of alkaline protease activity and stability via covalent immobilization onto hollow core-mesoporous shell silica nanospheres. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(184), 1-18, 2016.
- [108] Silva, C.J.S.M., Zhang, Q., Shen, J., Cavaco-Paulo, A., Immobilization of proteases with a water soluble–insoluble reversible polymer for treatment of wool. *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 634–640, 2006.

- [109] Chellapandian, M., Preparation and characterization of alkaline protease immobilized on vermiculite. *Process Biochem.*, 33(2), 169-173, 1998.
- [110] Geethanjali, S., Subash, A., Optimization and immobilization of purified *Labeo rohita* visceral protease by entrapment method. *Enzyme Res.*, 1-7, 2013.
- [111] Su, R., Shi, P., Zhu, M., Hong, F., Li, D., Studies on the properties of graphene oxide-alkaline protease bio-composites. *Bioresource Technol.*, 115, 136-140, 2012.
- [112] Ganesh Kumar, A., Swarnalatha, S., Kamatchi, P., Sekaran, G., Immobilization of high catalytic acid protease on functionalized mesoporous activated carbon particles. *Biochem. Eng. J.*, 43, 185-190, 2009.
- [113] Durgun Altun, G., Akkus Cetinus, S., Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chem.*, 100, 964-971, 2007.
- [114] Hmidet, N., El-Hadj Ali, N., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S.K., Nasri, M., Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochem. Eng. J.*, 47, 71-79, 2009.
- [115] Rai, S.K., Mukherjee, A.K., Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwpase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochem. Eng. J.*, 48, 173-180, 2010.
- [116] Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource Technol.*, 100, 3366-3373, 2009.
- [117] Grbavcic', S., Bezbradica, D., Izrael-Zivkovic', L., Avramovic', N., Milosavic', N., Karadzic', I., Knezevic'-Jugovic, Z., Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: Compatibility study with detergent ingredients and washing performance. *Bioresource Technol.*, 102, 11226-11233, 2011.
- [118] Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Ben Ayed, H., Manni, L., Agrebi, R., Nasri, M., Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochem.*, 46, 1248-1256, 2011.

- [119] Hashim, M.M., Mingsheng, D., Iqbal, M.F., Xiaohong, C., Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Phytochemistry*, 72, 458–464, 2011.
- [120] Mazorra-Manzano, M.A., Perea-Gutiérrez, T.C., Lugo-Sánchez, M.E., Ramirez-Suarez, J.C., Torres-Llanez, M.J., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B., Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chem.*, 141, 1902–1907, 2013.
- [121] Nasr, A.I.A.M., Ahmed, I.A.M., Hamid, O.I.A., Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Food Sci. Nutr*, 4(5), 733–741, 2016.
- [122] Neitzel, J.J., Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. *Nature*, 3(9), 21, 2010.



ÖZGEÇMİŞ

Esmâ Hande ALICI, 1984 yılında Sakarya’da doğdu. Ortaöğrenimini Hendek Atike Hanım Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2002 yılında kazandığı Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü’nden, 2007 yılında bölüm üçüncülüğü ve biyokimyager ünvanı ile mezun oldu. Takip eden iki yıl içerisinde Sakarya’da çeşitli ortaöğretim kurumlarında ücretli öğretmen olarak görev yaptı. 2009 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. “Kaldırık (*Trachystemon orientalis* L.) bitkisinden Polifenol oksidaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu” isimli yüksek lisans tezini 2012 yılında tamamladı. 2010 yılında Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Bilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak başladığı görevine halen devam etmektedir. Yabancı dili İngilizcedir.