

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TERMOFİLİK BİR KÜF OLAN *Scytalidium thermophilum*'dan
PROTEAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
KISMİ KARAKTERİZASYONU**

GÜLEN SİNEM İNCİ

KOCAELİ 2021

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TERMOFİLİK BİR KÜF OLAN *Scytalidium thermophilum*'dan
PROTEAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
KISMİ KARAKTERİZASYONU**

GÜLEN SİNEM İNCİ

Doç. Dr. Yonca Yüzügüllü KARAKUŞ

Danışman, Kocaeli Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi G. Ebru ÖZER UYAR

Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra GÜRKÖK

Jüri Üyesi, Atatürk Üniversitesi

.....

Tezin savunulduğu tarih: 21.06.2021

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışma *Scytalidium thermophilum* proteazı üretim koşullarının optimizasyonu, kültür ortamından enzimin saflaştırılması ve karakterize edilmesi amacıyla yapılmıştır. *S. thermophilum*'dan proteaz enziminin saflaştırılması ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisansım süresince gerek deneysel gerekse manevi anlamda bana olan desteğini ve inancını asla esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ'a, çalışmalarımın gerçekleşmesinde gerekli ekipman ve laboratuvar imkanlarını sunan değerli Biyoloji bölümü öğretim elemanlarına, her zaman yanımda olan arkadaşlarım Bektöre MANSUROV, Duygu AYDIN, Dilek AKSOY, Bedirhan ÖZTÜRK ve Çiğdem AKÇAY'a, bilimsel deneyimlerini aktarmaktan çekinmeyen değerli hocam Elif KALE ve sevgili arkadaşlarım Semih IŞIK ve Günce GÖÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle hayatımın şekillenmesinde büyük payı olan sevgili aileme sonsuz minnetlerimi sunarım.

Son olarak, tez çalışmamı destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (Proje No: 2019/048) şükranlarımı sunarım.

Haziran – 2021

Gülen Sinem İNCİ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	2
1.1. Proteazlar (EC 3.4)	2
1.2. Proteaz Enziminin Endüstriyel Kullanım Alanları.....	5
1.2.1. Deterjan endüstrisi	7
1.2.2. Gıda endüstrisi	7
1.2.3. İlaç endüstrisi	8
1.2.4. Tekstil endüstrisi	9
1.2.5. Bakım ürünleri	9
1.2.6. Gümüş geri kazanımı	10
1.2.7. Atık işleme	10
1.2.8. Peptit sentezi	10
1.3. Proteaz Enzim Üreticileri	11
1.3.1. Bitkisel proteaz üreticileri	11
1.3.2. Hayvansal proteaz üreticileri.....	11
1.3.3. Mikrobiyal proteaz üreticileri	12
1.4 Mikrobiyal Kaynaklı Proteazların Üretimi ve Saflaştırılması.....	14
1.5.ATPS (Aqueous Two Phase Partitioning System / Sulu İkili Faz Ayırma Sistemi).....	16
1.6. <i>Scytalidium thermophilum</i>	17
2. MALZEME VE YÖNTEMLER	20
2.1. Malzemeler	20
2.1.1. Kimyasallar	20
2.1.2. Mikroorganizma.....	20
2.2. Yöntemler	20
2.2.1. <i>Scytalidium thermophilum</i> 'dan proteaz üretimi	20
2.2.2. Proteaz aktivite tayini.....	22
2.2.4. <i>S. thermophilum</i> proteazının sulu ikili faz sistemiyle saflaştırılması	23
2.2.5. <i>S. thermophilum</i> 'dan proteaz enziminin kromatografi ile saflaştırılması.....	24
2.2.6. <i>S. thermophilum</i> proteaz enziminin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez analizi.....	25
2.2.7. <i>S. thermophilum</i> proteazının kısmi karakterizasyonu	25

3. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
3.1. <i>S. thermophilum</i> 'dan Proteaz Üretiminin Optimizasyonu	28
3.2. <i>S. thermophilum</i> 'dan Proteaz Enzimin Saflaştırılması.....	32
3.2.1 Sulu ikili faz sistemi ile saflaştırma.....	32
3.2.2. Kromatografik yöntem ile saflaştırma	37
3.3. SDS-PAGE Analizi	39
3.4. Saflaştırılmış <i>S. thermophilum</i> Proteazının Karakterizasyonu	41
3.4.1. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	41
3.4.2. Reaksiyon pH'sının enzim aktivitesi üzerine etkisi	42
3.4.3. Proteaz termal kararlılığı.....	43
3.4.4. <i>S. thermophilum</i> proteazının pH kararlılığı.....	44
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	47
EKLER.....	57
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	64
ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Proteaz aktivite mekanizması	2
Şekil 1.2. Proteazların katalitik özelliklerine göre sınıflandırılması.....	3
Şekil 1.3. <i>S. thermophilum</i> sporları.....	18
Şekil 3.1. <i>S. thermophilum</i> ' un zamana karşı proteaz aktivite (U/mL) grafiği.....	28
Şekil 3.2. <i>S.thermophilum</i> 'un glukoz konsantrasyonuna (% , a/h) karşı proteaz aktivite grafiği.....	30
Şekil 3.3. <i>S. thermophilum</i> 'un azot kaynağı ve konsantrasyonuna (% , a/h) karşı proteaz aktivite (U/mL) grafiği.....	31
Şekil 3.4. Metal iyon kaynağı ve konsantrasyonun proteaz aktivitesi üzerinde etkisi.....	32
Şekil 3.5. <i>S. thermophilum</i> ' dan saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE jel görüntüsü.....	40
Şekil 3.6. <i>S. thermophilum</i> proteazının farklı sıcaklıklardaki bağıl aktivite grafiği	41
Şekil 3.7. <i>S. thermophilum</i> proteaz aktivitesine pH'nın etkisi.....	43
Şekil 3.8. <i>S. thermophilum</i> proteazının termal kararlılığı	44
Şekil 3.9. <i>S. thermophilum</i> proteazının pH kararlılığı	44
Şekil C.1.Standart BSA eğrisi.....	62
Şekil D.1.Moleküler ağırlık tayininde kullanılan grafik	63

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Proteazların katalitik işlevlerine göre sınıflandırılması	4
Tablo 1.2. Proteaz enzimi uygulama alanları	6
Tablo 1.3. Bitkisel kaynaklı proteaz üreticileri tarafından üretilen enzimler	11
Tablo 1.4. <i>S. thermophilum</i> 'un taksonomik sınıflandırılması	19
Tablo 3.1. Sistem pH'sı ve PEG molekül ağırlığının proteaz dağılımına etkisi	34
Tablo 3.2. PEG 6000 konsantrasyonunun proteaz dağılımına etkisi	35
Tablo 3.3. Sodyum sitrat konsantrasyonunun proteaz dağılımına etkisi	36
Tablo 3.4. NaCl konsantrasyonunun proteaz dağılımına etkisi	37
Tablo 3.5. ATPS yöntemiyle saflaştırılan proteaz enzim örnekleri	37
Tablo 3.6. Proteaz enziminin saflaştırma basamakları	38
Tablo 3.7. Kromatografik yöntemle saflaştırılan bazı proteaz enzimlerine ait bulguların karşılaştırılması	38
Tablo 3.8. Farklı mikroorganizmalardan izole edilen proteaz enzimlerinin molekül ağırlıklarının karşılaştırılması	40
Tablo 3.9. Farklı mikroorganizmalardan izole edilen proteaz enzimlerinin sıcaklık ve pH profillerinin karşılaştırılması	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	:Yüzde
=	:Eşittir
μ L	:Mikrolitre
g	:Gram
L	:Litre
M	:Molar
mL	:Mililitre
mM	Milimolar
μ L	:Mikrolitre
nm	:Nanometre
$^{\circ}$ C	:Santigrat Derece
U	:Unit-Enzim Birimi
U/mg	:Unit/miligram-Spesifik Aktivite Birimi
g/L	:Gram/Litre
mg/mL	:Miligram/Mililitre
kDa	:Kilodalton

Kısaltmalar

(a/a)	:Ağırlık/Ağırlık
(a/h)	:Ağırlık/Hacim
(h/h)	:Hacim/Hacim
APS	:Amonyum Persülfat
ATPS	:Aqueous Two Phase System (Sulu İkili Faz Sistemi)
BSA	:Bovine Serum Albumin
CaCl ₂	:Kalsiyum Klorid
dH ₂ O	:Deiyonize Su
EC	:Enzyme Commission
HCl	:Hidroklorik Asit
KCl	:Potasyum Klorid
K ₂ HPO ₄	:Di Potasyum Fosfat
MgCl ₂	:Magnezyum Klorid
MgSO ₄ .7H ₂ O	:Magnezyum Sülfat Yedi Sulu
NaCl	:Sodyum Klorid
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	:Sodyum Sitrat
NaOH	:Sodyum Hidroksit
PEG	:Polietilen Glikol
pH	:Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
rpm	:Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)

SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	:Tetrametiletilendiamin
t-Bütanol	:Tert Bütanol
V	:Volt
YpSS	:Yeast Powder Soluble Starch (Maya Ekstraktı ve Çözünebilir Nişasta İçeren Besiyeri



TERMOFİLİK BİR KÜF OLAN *Scytalidium thermophilum*'dan PROTEAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRMASI VE KİSMİ KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Protein yapısındaki peptit bağlarının hidrolizinden sorumlu olan proteazlar, oldukça geniş bir grubu temsil etmektedir. Çalışmada, termofilik bir küf olan *Scytalidium thermophilum*'dan hücre dışı proteaz enziminin optimum fermentasyon koşullarında üretimi, saflaştırılması ve kısmi karakterizasyonu amaçlandı. Buna göre, %4 (a/h) glukoz, %1 (a/h) maya ekstraktı, %0,05 (a/h) MgSO₄.7H₂O, %0,04 (a/h) KCl ve %0,1 (a/h) K₂HPO₄ içeren 250 mL YpSS Broth besiyerinde büyütülen mikroorganizmadan üç günlük fermentasyon sonunda hücreler uzaklaştırılarak ham enzim ekstraktı elde edildi. Saflaştırma hem klasik kromatografi hem de sulu ikili faz sistemi (ATPS) uygulanarak gerçekleştirildi ve saflaştırma bulguları karşılaştırıldı. ATPS'ye maruz bırakılan ham ekstrakt örneğinden 5,1-kat ve %78 aktivite geri kazanımla proteaz enzimi saflaştırıldı. HiPrep Q XL (16/10) kolonundan ise proteaz enzimi %22 geri kazanımla yaklaşık 3-kat saflaştırıldı. SDS-PAGE'de her iki yolla saflaştırılan proteaz örneğine ait tek bant gözlemlendi, protein bandının molekül ağırlığı ~80 kDa olarak hesaplandı. Enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 60 °C ve 8,0 olarak tespit edildi. Kararlı olduğu sıcaklık aralığı 30–60 °C, pH aralığı ise 4,0–9,0 olarak belirlendi. *S. thermophilum*'dan ilk defa bu çalışmada saflaştırılan proteaz enziminin sıcaklık ve pH değişimlerine gösterdiği kararlılık, enzimin farklı endüstriyel uygulamalarda kullanımına yatkın olduğuna işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Karakterizasyon, Kromatografi, Optimizasyon, Proteaz, *S. thermophilum*.

PRODUCTION, PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF PROTEASE ENZYME FROM THERMOPHILIC FUNGUS *Scytalidium thermophilum*

ABSTRACT

Proteases, which are responsible for the hydrolysis of peptide bonds in the protein structure, represent a very large group of enzymes. In this study, it was aimed to produce, purify and partially characterize extracellular protease enzyme from a thermophilic fungus, *Scytalidium thermophilum*, under optimum fermentation conditions. For this purpose, *S. thermophilum* was grown in 250 mL of YpSS Broth medium including 4% (w/v) glucose, 1% (w/v) yeast extract, 0.05% (w/v) MgSO₄·7H₂O, 0.04% (w/v) KCl and 0.1% (w/v) K₂HPO₄. After three days of fermentation, the cells were removed and crude enzyme extract was obtained. Purification was carried out using both conventional chromatography and aqueous two-phase partitioning system (ATPS), and purification parameters observed were compared. The protease enzyme was purified with a 5.1-fold and 78% activity recovery from ATPS. With HiPrep Q XL (16/10) column, purification fold and activity recovery values were 3-fold and 22%, respectively. The purity was checked with SDS-PAGE analysis where a single band corresponding to ~80 kDa was observed. The optimum temperature and pH values of the purified enzyme were determined as 60 °C and 8.0, respectively. The enzyme was found stable in a temperature range of 30–60 °C, while it was stable in pH values varying from 4.0 to 9.0. The stability of the *S. thermophilum* protease enzyme, purified here for the first time, against different temperature and pH values, indicates that the enzyme has a potential for its use in different industrial applications.

Keywords: Characterization, Chromatography, Optimization, Protease, *S. thermophilum*.

GİRİŞ

Enzimlere ekonomik ve ekolojik avantajları nedeniyle endüstriyel sektörlerdeki talep sürekli artmaktadır. Mikroorganizmalar, kendi metabolizmalarını, savunma sistemlerini ve normal fizyolojik durumlarını sürdürmek için farklı tipte hücre dışı enzimler üretirler. Hidrolaz sınıfına dahil olan proteazlar, endüstriyel sektörlerde özel ilgi görmektedir. Bu sebeple araştırmacılar tarafından proteaz enzim kaynağı olarak çeşitli organizmalar hedef gösterilmektedir; ancak bunlar arasında mikrobiyal kaynaklı olanlar düşük maliyet, yüksek üretim hızı, bulunabilirlik, kararlılık ve çeşitlilik nedeniyle hayvan ve bitki kaynaklarından elde edilen enzimlere göre daha yüksek ticari değere sahiptirler.

Geniş bir bakteri ve mantar grubu hücre dışı proteaz üretmektedir; ancak proteaz üreten mikroorganizmaların çoğu *Bacillus* türlerine aittir. Diğer taraftan *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus* ve *Thermomyces* gibi mantarlardan da proteaz üretimi gerçekleştirilmektedir.

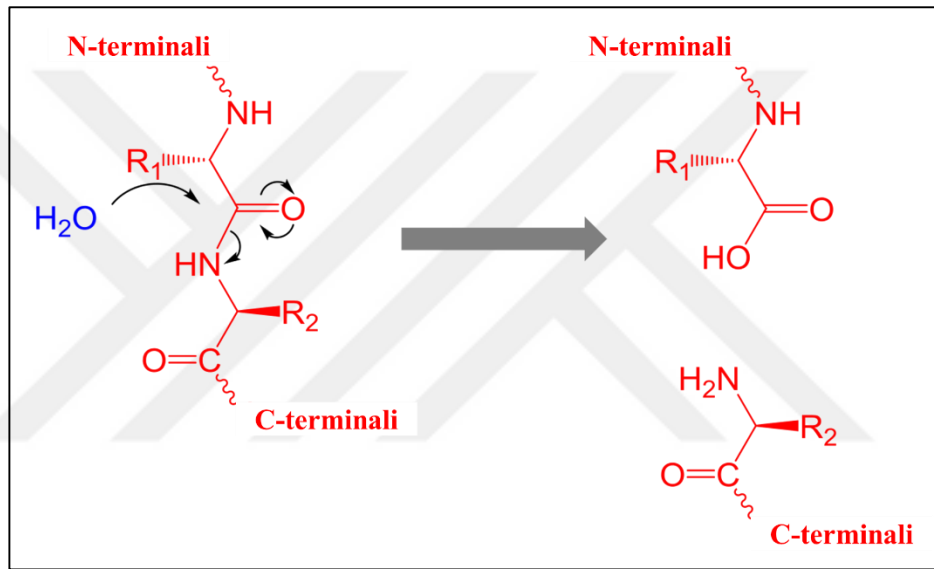
Bu çalışma termofilik bir küf olan *S. thermophilum*'dan hücre dışı proteaz enziminin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonunu kapsamaktadır. Buna göre, endüstriyel bir enzim olarak bilinen proteazın termofilik bir mikroorganizmadan kısa sürede, yüksek verimde ve düşük maliyette elde edilmesi amacıyla *S. thermophilum*'un fermantasyon koşulları optimize edildi. Daha sonra kültür ortamından iki farklı yöntemle (sulu ikili faz sistemi ve iyon değişim kromatografisi) saflaştırma yapılarak en uygun saflaştırma tekniği belirlendi. Son olarak, saflaştırılan proteaz enziminin jel elektroforez ile moleküler ağırlığı belirlenerek sıcaklık ve pH gibi farklı fiziksel koşullar altında kararlılığı analiz edildi.

Çalışmada *S. thermophilum* proteazı ilk kez saflaştırıldığından özgün değer taşımaktadır. Ayrıca, iki farklı saflaştırma yöntemine ait bulguların aynı çalışmada değerlendirilmesi ve literatürle karşılaştırılmış olması bakımından özgündür. Enzimin biyokimyasal özellikleri literatürle benzerlik göstermiştir. Kararlılık testleri enzimin endüstriyel alanda kullanımının uygun olduğuna işaret etmektedir.

1. GENEL BİLGİLER

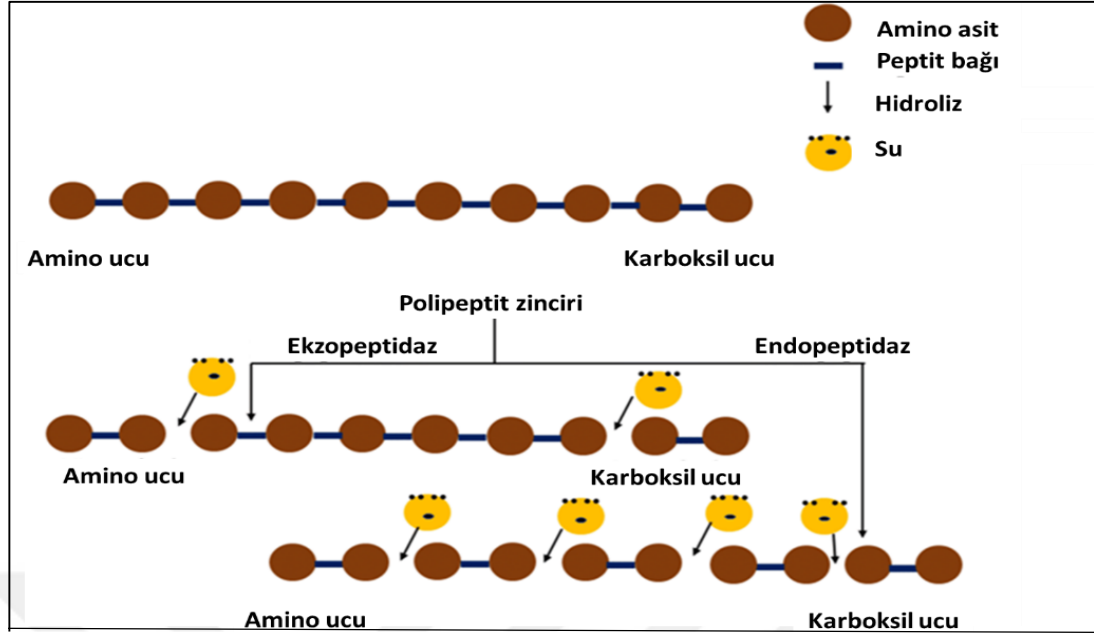
1.1. Proteazlar (EC 3.4)

Proteinaz veya peptidaz olarak da bilinen proteazlar, enzim sınıflarından hidrolaz ailesinin bir üyesi olup polipeptit zincirindeki amid bağlarının hidrolizini katalizler (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Proteaz aktivite mekanizması (URL-1)

Proteazlar oldukça geniş bir sınıfı temsil etmekle birlikte katalizledikleri reaksiyon tipi, katalitik bölgelerinin kimyasal ilişkileri ve yapılarına göre farklı sınıflandırılmalara tabi tutulurlar (Singh ve diğ., 2016; Gurumallesh ve diğ., 2019). Katalitik işlevlerine göre yapılan sınıflandırmada iki ana grup ve bu gruplara bağlı sekiz farklı alt grup yer alır (Tablo 1.1.). Proteinleri karboksil (C-terminal) ya da amino (N-terminal) uçlarından ayıran gruba ekzopeptidaz adı verilirken, hedef proteinleri iç kısımlarından parçalayan proteaz grubu endopeptidaz olarak isimlendirilir, Şekil 1.2'de gösterilmektedir (McDonald, 1985; Yıldırım, 2014; Clark ve Pazdernik, 2016). Ekzopeptidazlar, hedef aldıkları amino veya karboksil uça bulunan amino asit(ler) dikkate alınarak aminopeptidaz ve karboksipeptidaz olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar (Barrett, 2000).



Şekil 1.2. Proteazların katalitik özelliklerine göre sınıflandırılması (Idowu ve diğ., 2021)

Amino peptidazlar, bitki ve hayvanlarda geniş bir şekilde dağılış göstermekte olup birçok subzellüler organelde, sitoplazmada veya zar bileşenleri olarak bulunurlar (Taylor, 1993). Amino peptidazların çoğu hücre içi enzim olmakla birlikte hücre dışına salgılanan örnekleri de mevcuttur (Gurumallesh ve diğ., 2019). Amino peptidazlar birçok temel hücresel işlevi yerine getirirler; bu peptidazların tümü olmasa da çoğu çinko metalloenzimleridir ve bestatin tarafından inhibe edilir. Bazıları monomerik yapıya sahipken bazıları nispeten yüksek kütleli (50 kDa) alt birimlerden oluşan gruplar şeklindedir (Taylor, 1993). Üç boyutlu yapısı belirlenen sadece dört amino peptidaz (*Vibrio proteolyticus* [PDB Kodu: 1AMP], *Xanthomonas citri* [PDB Kodu: 1AZW], *Homo sapiens* [PDB Kodu: 1BN5] ve *Pyrococcus furiosus*'dan [PDB Kodu: 1XGS] izole edilmiş amino peptidazlar) bulunmaktadır.

Karboksi peptidazlar, polipeptit zincirinin karboksil ucuna etki ederek tek bir aminoasidi veya dipeptiti serbest bırakırlar (Dadı, 2012). Karboksi peptidazlar, aktif bölgelerinde yer alan amino asit veya metal grubuna göre; *serin*, *metallo* ve *sistein* karboksi peptidaz olarak üç alt gruba ayrılırlar (Sarı, 2011). İnsanlar, hayvanlar, bitkiler ve bakteriler olmak üzere geniş bir yayılım gösteren karboksi peptidazlar, katabolizmadan protein olgunlaşmasına kadar çok sayıda farklı işlevlere sahip olmakla birlikte yüksek düzeyde çeşitlilik gösterirler. Bilinen ilk karboksi peptidazlar, gıdanın

sindirimi ile ilgili olan pankreas karboksipeptidaz A1, A2 ve B'dir. Bununla birlikte, bilinen karboksipeptidazların çoğunun katabolizma yerine proteinlerin post-translasyonel modifikasyonu veya biyolojik süreçleri düzenlemeye yardımcı oldukları tespit edilmiştir. Örneğin, insülin gibi nöroendokrin peptitlerin biyosentezi, bir karboksipeptidaz gerektirir. Karboksipeptidazlar ayrıca kanın pıhtılaşmasında, büyüme faktörü üretiminde, yara iyileşmesinde, üremede ve diğer birçok işlemde işlev görmektedir (URL-2).

Tablo 1.1. Proteazların katalitik işlevlerine göre sınıflandırılması

Proteaz		EC Numarası
	Amino peptidaz	3.4.11
Ekzopeptidaz	Serin	3.4.16
(Ekzoproteaz)	Karboksipeptidaz	Metallo 3.4.17
	Sistein	3.4.18
	Serin proteaz	3.4.21
	Sistein proteaz	3.4.22
Endopeptidaz	Aspartik proteaz	3.4.23
(Endoproteaz)	Metalloproteaz	3.4.24
	Katalitik mekanizması bilinmeyen proteazlar	3.4.99

Endoproteazlar polipeptit zincirinin N- ve -C terminal uçları yerine zincirin iç kısmında bulunan peptit bağlarının yapısındaki N- ve -C terminal uçlarına etki etmeleriyle karakterize edilirler (Rao ve diğ., 1998).

Bilinen tüm proteolitik enzimlerin üçte birinden fazlası serin proteazlardır. İsimlerini aktif bölgelerinde bulunan serin amino asidinden alırlar. Katalitik bölgede bulunan nükleofilik serin, aspartat ve histidin ile katalitik üçlü bir yapı oluştururlar. Serin proteazların çoğu substrat spesifitesi gösterir; polipeptit zincirindeki peptit bağı tirozin, fenilalanin ya da lösinin karboksil ucundan hidrolizlerler. Virüsler, bakteriler ve ökaryotlarda yaygın olarak bulunurlar. Birbirine yapısal açıdan benzeyen serin proteazlar kırk aile olarak gruplanmıştır, buna ek olarak yaygın on üç atasal klana sahiptir (Di Cera, 2009). Serin proteazların optimum aktiviteleri pH 7,0 – 11,0 aralığında değişmekte olup izoelektrik noktaları 4,0 ila 7,0 arasındadır (Singh, 2016).

Bilinen en yaygın inhibitörleri PMSF (fenilmetilsülfonilflorür), di-izopropilflorofosfat (DFP), tosil-L-lizin klorometil keton (TLCK) ve 3,4-dikloroizokumarindir (3,4-DCI) (Rao ve diğ., 1998).

Tiyol proteazları olarak da bilinen sistein proteazlar, serin proteazları gibi isimlerini aktif bölgelerinde katalitik mekanizmada önemli rol oynayan sisteinden alırlar ve bu sistein merkezdeki histidin ve aspartik asitle birlikte katalitik üçlü bir yapı oluşturur. Günümüze kadar yaklaşık yirmi sistein proteaz ailesi tanımlanmıştır (Gurumallesh, 2019). Optimum pH'ları nötral veya zayıf alkalidir (Sriket, 2013). Çoğunlukla virüslerde, bakterilerde, mantarlarda, protistalarda ve bitkilerde bulunur. Memelilerde ise kalpain ve lizozomal katepsin olmak üzere iki ana sistein proteaz grubu vardır. Bitkilerde bulunan papain yine bu grubun en bilindik üyelerindendir (Rao ve diğ., 1998). Sistein proteazlar, PCMB (parakloromerkuribezoat) gibi sülfidril ajanlara duyarlılık gösterirken metal-şelatlayıcılardan biri olan DFP (diizopropil florofosfat)'den etkilenmemektedirler (Turus, 2011).

Metalloproteazlar, katalitik bölgelerinde divalent metal iyonları (çoğunlukla Zn^{+2}) barındırırlar. Metalloproteazların sınıflandırması proteinin katalitik bölgesine göre yapılmaktadır. Optimum pH'ları 5,0 – 9,0 arasındadır (Özden, 2014). Metalloproteazlar metal şelatlayıcı olarak bilinen EDTA tarafından inhibe olmakta ancak sülfidril ajanı veya DFP ile inhibe olmamaktadır; bu şekilde diğer proteazlardan kolaylıkla ayrılır (Öner, 2009).

Aspartik proteaz enzimi aktif bölgesinde aspartik asit bulundurur. Çoğunun maksimum aktivitesi pH 3,0 – 4,5 aralığında gerçekleşir ve izoelektrik noktaları 3,0 ila 4,5 arasındadır (Rao ve diğ., 1998). Üç gruba ayrılırlar, bunlar; pepsin (A1), retropepsin (A2) ve pararetrovirüslerden (A3) elde edilen enzimlerden oluşur (Dadı, 2012). Aspartik proteazlar omurgalılarda, bitkilerde, mantarlarda, protozoonlarda, prokaryotlarda ve retrovirüslerde bulunurlar. Hayvanlarda bulunan pepsin en bilindik aspartik proteazlardandır (Santos ve diğ., 2013; Sawant ve Nagendran, 2014).

1.2. Proteaz Enziminin Endüstriyel Kullanım Alanları

Dünya genelinde farklı endüstrilerde kullanılan kimyasalların insan sağlığına ve çevreye karşı olan olumsuz etkileri gün geçtikçe artmaktadır. Bu durumun önüne

geçmek için zararlı kimyasalların çevre dostu ürünlerle değiştirilmesi ve dünyaya verilen zararın düzeltilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bilim insanlarının önceliği enzimatik süreçleri kimyasal süreçlerin yerine geçirmektir (Razzaq ve diğ., 2019).

Proteaz enzimi dünya pazar payının %60'a yakın kısmını oluşturan üç büyük endüstriyel enzim grubundan biridir (Rani ve diğ., 2012). Birçok farklı alanda kullanılır. Özellikle deri, deterjan, gıda, atık işleme, ağır metal (gümüş) geri kazanımı ve peptit sentezi gibi alanlarda kullanımı oldukça yaygındır (Silva ve diğ., 2017). Proteazların farklı endüstrilerdeki kullanım amaçları Tablo 1.2'de verilmiştir.

Tablo 1.2. Proteaz enzimi uygulama alanları (Singh ve diğ., 2016).

Endüstri	Kullanım amacı
Deterjan	Yıkama işlem veriminin artırılması
Gıda	Sindirme kolaylığı, lezzet artırma, viskoelastik özellikler kazandırma, etin yumuşatılması, alerjenliğin azaltılması vb.
İlaç	Kansere karşı uygulamalar, immün sistemin güçlendirmesi
Tekstil	Ağartma, kumaşın güçlendirilmesi, derinin tüylerden arındırılması
Kişisel bakım	Cildin kirlerden arındırılması ve yumuşatılması
Ağır metal geri kazanımı	Gümüş tabakayı filminden ayırma
Atık işleme	Hayvansal atıkların yem haline getirilmesi
Peptit sentezi	Asimetrik peptit sentezi

Proteazların birçoğu kendilerine özgü mekanizmaları ve uygulama alanlarından dolayı dünya genelinde oldukça dikkat çekmiş, fiziksel ve biyoteknolojik çalışmalarda kullanılmışlardır. Ekolojik olarak güvenli olduğu düşünülen enzimlerin toksik ve patojenik özellik göstermemesi sebebiyle ticari olarak kullanılabilmesi öne sürülmüştür (Sawant ve Nagendran, 2014).

Hayvanlardan, bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilebilen bu enzimin mikrobiyal kaynaklı olanları yaygın olarak endüstride kullanılmaktadır (Singh ve diğ., 2016). Özellikle fungal ve bakteriyel enzimler üretimlerinin kolay ve hızlı olmasından

dolayı sıklıkla tercih edilir. Çoğu fungal enzim ekstraselüler ve işlenmeye uygun durumdadır (Kudryavtseva ve diğ., 2008; Thirunavukkarasu ve diğ., 2017).

1.2.1. Deterjan endüstrisi

1913 yılında ilk kez bir deterjanın yapısında kullanılan pankreatik ekstraktını, sonradan farklı kaynaklardan elde edilen çeşitli proteazlar izlemiştir (Singh ve diğ., 2016). Deterjan endüstrisinde kullanılan proteazlar toplam enzim endüstrisinde yaklaşık %20'lik bir paya sahiptir. Çoğunlukla evlerde çamaşırların temizliğinde kullanılmakla birlikte protez ve kontakt lens temizleyicilerinin içeriğinde de bulunmaktadır (Razzaq ve diğ., 2019). Ayrıca bulaşık makinesi deterjanlarında yer aldığı hatta lipazlarla beraber kullanıldıklarında oldukça iyi bir yağ ve protein artığı çözücüsü olduğu unutulmamalıdır (Özçömlekçi, 2006).

İdeal deterjan proteazları, birçok lekenin (yemek, kan, çim ve vücut salgıları) temizlenmesinde etkili olması için geniş bir substrat spesifitesine sahip olmalıdır. Bu özelliklerinin yanında deterjanlara eklenen kenetleyici ve oksitleyici ajanlarla uyumlu olması, yüksek sıcaklık ve pH'larda aktivite göstermesi ve kararlı olması gibi özellikleri başlıca gereksinimlerdir. Proteaz enziminin pI (iyonik güç) değerinin bilinmesi enzimin performansını en iyi şekilde göstermesi için anahtar bileşendir. Deterjan solüsyonundaki proteazın pH değeri ve iyonik gücü birbirine denk olduğunda, uygulamanın daha etkin olduğu gözlenmiştir (Rani ve diğ., 2012). Çamaşır yıkama sırasında düşük ısıda ve kısa sürede temizlik yapılmasını sağlayan proteazlar aynı zamanda kumaş yıpranmasının da önüne geçmektedir (Özçömlekçi, 2006). Günümüzde biyomühendisler rekombinant DNA (rDNA) teknolojisini kullanarak yüksek kararlılığa ve uzun raf ömrüne sahip proteaz üretimi için çalışmaktadırlar (Razzaq ve diğ., 2019).

1.2.2. Gıda endüstrisi

Proteaz enzimlerinin gıda endüstrisinde uzun yıllardır kullanıldığı bilinmektedir. Özellikle peynir yapımında misel oluşumunu engelleme ve kappa kazeini hidrolize etmek amacıyla proteaz enzimi eklenmektedir. Ayrıca hamura esneklik kazandırmak amacıyla yine proteaz ilavesi yapılmaktadır (Arya ve diğ., 2020). Bu özellikleri

nedeniyle beyaz ekmek, poğaçca, kek, bisküvi ve kraker yapımında sıklıkla tercih edilirler (Rao ve diğ., 1998).

Fırıncılıkta gluten olarak adlandırılan çözünmesi oldukça zor olan ve hamurun yapısını belirleyen protein, proteaz enzimleri tarafından hidroliz edilmektedir. Glutenin hidrolizasyonu sayesinde hamuru karıştırma süresi azalmakta ve hamurun daha çok kabarması sağlanmaktadır (Sawant ve Nagendran, 2014).

Proteazların bağ dokularında ve kas liflerinde bulunan proteinleri hidrolize edebilme yeteneği etin yumuşatılmasında kullanılmaktadır (Singh ve diğ., 2016). Proteazlar ayrıca bira mayalarını parçalayıp ve biranın daha berrak hale gelmesini sağlayabilmektedirler (URL-2).

Kazein sayesinde alkalen proteaz içeren peynir altı suyu ve soya proteinlerinden protein hidrolizatları elde edilmektedir. Bu zengin protein içerikleri, bebek maması yapımında, terapötik besinlerde ve meyve sularının zenginleştirilmesinde tercih edilmektedir (Dadı, 2012; Razzaq ve diğ., 2019).

1.2.3. İlaç endüstrisi

Proteazların çeşitliliği ve özgüllüğü, etkili terapötik ajanların geliştirilmesinde büyük avantaj sağlamaktadır. Vücuttaki proteazın tüketilmesi ağrı, burkulma ve yaralanmalara karşı vücudun hassas hale gelmesine, dolayısıyla bağışıklık sisteminin zayıflamasına sebep olmaktadır. Bununla beraber proteaz seviyesindeki azalma kansere de sebep olabilmektedir (Chanalia ve diğ., 2011).

Vücuttaki çeşitli ihtiyaçları gidermek veya eksik enzim ihtiyacını karşılamak için enzim takviyeleri üretilmektedir. Sindirim sistemini desteklemek için üretilen ilaçlarda proteazlar kullanılmaktadır (Rao ve diğ., 1998).

Kollojenaz ve subtisilin gibi enzimler yara ve yanıkların tedavisinde geniş spektrumlu antibiyotiklerle beraber kullanılmaktadır (Dadı, 2012). Yine bir proteaz olan serratiyoproteazlar akut ve kronik iltihaplanmalara karşı oldukça etkilidir. Aynı zamanda ağrıya sebep olan bradikinin gibi peptit salınımını da engellemektedir (Singh ve diğ., 2016). Asparijanz enzimi ise lenfositik lösemi ve çeşitli türlerinde kan akışındaki asparajininin azaltılması için tercih edilmektedir (Tolan, 2015).

1.2.4. Tekstil endüstrisi

Tekstil sanayinde proteazlar, genelde ürünlerin ön işleminde kullanılmaktadır. Papain, pronaz ve pepsin gibi proteazların yünler ile muamele edildiğinde liflerin esneklediği ve beyaz bir renk elde edildiği görülmüştür. İplik de aynı şekilde proteolitik enzimlerle işlenirse, yapısında bulunan “serisinin” ipliğin kayganlığını ve parlaklığını etkilediği gözlenmiştir (Tolan, 2015).

İnsanlığın sosyo ekonomik aktiviteleri arttıkça dünya genelindeki çevresel problemler de artmaktadır. Üretim endüstrisi de (özellikle deri üretimi) bu çevresel problemlerin birçoğunda önemli bir rol oynamaktadır (Khambhaty, 2020). Proteaz enzimi derinin işlenmesinde büyük bir paya sahiptir. Derinin işlenmesi kireçleme, ıslatma, tüy ve yünün deriden uzaklaştırma, tabaklama, samalama, yağlardan arındırma ve temizleme gibi aşamaları içerir. Alkalen proteazlar tüy giderme aşamasında zararlı bir kimyasal olan Na₂SO₄ yerine kullanıldığında çevresel problemlerin kısmen önüne geçilmiş olunur (Arya ve diğ., 2020).

Proteazlar derideki fibril yapıda olmayan proteinleri elemek ve kollojen olmayan bileşenleri indirgemek amacıyla da kullanılabilir. Diğer yandan, suyun daha hızlı emilmesini sağlayarak ıslatma için gereken zamandan tasarruf sağlayabilmektedir. Sodyum sülfat ve kalsiyum hidroksitle beraber kullanıldığında ise tüy ve yün giderme aşamalarında ortaya çıkan atık miktarı azalmaktadır (Singh ve diğ., 2016).

Proteaz enziminin deri endüstrisinde kullanımın sağladığı avantajlar yanında dezavantajları da vardır bunlar; derinin bileşenlerinin deforme olarak fiberlerin yetersiz şekilde açılması, taneciklerin daha düz olması ve yüksek maliyete sebep olabilmesi şeklinde örneklendirilebilir. Bu sebeplerden ötürü enzim teknolojilerinde pratik seçenekler sunmasına rağmen henüz çalışmalardaki eksiklikler nedeniyle deri endüstrisinde proteaz enzimi kullanımı çoğu bilim insanı tarafından kabul görmemektedir (Khambhaty, 2020).

1.2.5. Bakım ürünleri

Cildi temizlemek, ölü deriden arındırmak veya nemlendirerek yumuşatma gibi amaçlar için proteaz enzimlerinden bromelain ve papain uzun yıllardır

kullanılmaktadır (Sunar ve diğ., 2016). Ayrıca saç ve diş bakım ürünlerinde de proteaz enzimleri bulunmaktadır (Yıldırım, 2014).

1.2.6. Gümüş geri kazanımı

Alkale proteazların gümüşün geri kazanımında önemli rolleri bulunmaktadır (Gupta ve diğ., 2002). Röntgen filmlerinde yer alan gümüş miktarı 5 ila 15 g/kg arasında değişmektedir. Gümüşün filmlerden geri kazanımı kimyasal veya enzimatik yolla yapılabilmektedir. Metalik gümüş oksidasyon yoluyla filmlerin kimyasal olarak yakılması çevre kirliliğe yol açmakta ve sağlık problemlerine sebep olmaktadır. Buna karşın mikrobiyal kaynaklı proteazlar kullanıldığında filme gömülü gümüş tabakasının soyulma işlemi kirlilik içermemektedir. Enzimatik yöntem yavaş gerçekleşmekte ancak hem kirliliği azaltmakta hem de maliyeti düşürmektedir (Saraswathy ve diğ., 2013).

1.2.7. Atık işleme

Proteazlar hem evsel hem de endüstriyel atıkları ayrıştırabilme potansiyeline sahiptir. Protein içerikli atıkların çözdürülmesi ve su sistemlerinin biyolojik oksijen taleplerinin azaltılmasını sağlamaktadırlar (Yıldırım, 2014).

Hayvansal atık giderimi için kümes hayvanları ve balık kaynaklı atıkların proteazlarla giderilmesi örnek verilebilir. Kümes hayvanlarının kuş tüyü atıkları proteaz enzimiyle parçalanarak hayvan yemi haline getirilmektedir (Tolan, 2015). Balık ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturan balık atık malzemeleri ise proteaz enzimi kullanılarak lipid, enzim ve kitin gibi biyomoleküllere dönüştürülmektedir (Yıldırım, 2014).

1.2.8. Peptit sentezi

Proteaz enzimi tarafından hidrolizin ters enzimatik reaksiyonu kullanılarak peptit sentezi ilk kez Bergman ve Frankel-Conrat (1937) tarafından kaydedilmiş, sonrasında ise proteaz varlığında peptit sentezi yaygınlaşmıştır (Yıldırım, 2014).

Kimyasal yolun tersine proteaz kullanarak peptit sentezinin gerçekleştirilmesi polar olmayan substratların çözünürlüğünün artması, hidroliz reaksiyonlarında termodinamik dengenin tersine çevrilmesi, suya bağlı yan reaksiyonların bastırılması

ve mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesi gibi pek çok avantajlara sahiptir (Yıldırım, 2014).

1.3. Proteaz Enzim Üreticileri

Proteaz enzimi bütün yaşam formları tarafından üretilmektedir. Oldukça fazla sayıda canlı organizmadan elde edilebilen proteaz enzimi insanlık tarihi boyunca birçok alanda kullanılmıştır. Ancak endüstride rağbet gören proteazların ana kaynağı mikroorganizmalardır. Mikrobiyal proteazların verimliliği bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteazlara göre daha yüksektir, kısa zamanda ve kısıtlı alanda üretilirler; bu özellikleri sebebiyle endüstriyel kullanım açısından diğer proteaz üreticilerine karşı daha fazla rağbet görürler (Dhillon ve diğ., 2017).

1.3.1. Bitkisel proteaz üreticileri

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanımı toprak ve iklim koşulları gibi birçok faktörün ekim için uygunluğuna bağlıdır (Rani ve diğ., 2012). Bitkiden proteaz üretiminde bitkinin büyüme koşullarını, protein üretim ve saflaştırma koşulları dikkate alınarak meydana gelecek zaman kaybı ve harcanacak işgücü gibi faktörlere dikkat edilmelidir (Gurumallesh ve diğ., 2019). Tablo 1.3'te bitkisel kaynaklı proteaz üreticileri tarafından üretilen enzimler ve uygulamalarına örnekler gösterilmektedir.

Tablo 1.3. Bitkisel kaynaklı proteaz üreticileri tarafından üretilen enzimler

Kaynak	Enzim	Uygulama	Referans
<i>Carica papaya</i>	Papain	Eti yumuşatma	Dhillon ve diğ., 2017
<i>Ficus carica</i>	Fisin	Ameliyat için dikiş malzemesi yapımı veya eti yumuşatma	Mótyán ve diğ., 2013
<i>Actinidia deliciosa</i>	Asitinidin	Süt pıhtılaştırma veya eti yumuşatma	Chalabi ve diğ., 2014
<i>Cucumis melo L.</i>	Kukumisin	Süt pıhtılaştırma, kollojen hidrolizi veya peptit sentezi	Silva-López ve Gonçalves, 2019

1.3.2 Hayvansal proteaz üreticileri

Hayvansal proteazlardan; rennin (rennet), kimotripsin, pankreatik tripsin, ve pepsin sindirim sürecinde önemli rol oynamaktadır (Gurumallesh ve diğ., 2019). Bu enzimler çoğunlukla sığırlardan elde edilirler; ancak, endüstriyel alandan gelen talepler üzerine

bu enzimlerin rekombinant varyantları üretilmiş ve etkileri test edilmiştir (Özcengiz, 2002).

Tripsin, pankreas kaynaklı bir serin proteaz olup bilimsel araştırma veya endüstriyel amaçlı bakteri üretimi için gerekli olan büyüme ortamının hazırlanmasında kullanılmaktadır. Kimotripsin hayvanların pankreatik sıvısından elde edilmekte, bu nedenle pahalı bir enzimdir. Medikal teşhis ve diğer analitik uygulamalarda sıklıkla yer almaktadır (Dhillon ve diğ., 2017). 2012 yılında yayınlanan bir ABD patent çalışmasında (Patent No. US20120135460 A1) rekombinant kimotripsin üretimi ve gıda uygulamalarında kullanımı gösterilmiştir. Pepsin tüm omurgalıların midesinde bulunan bir asidik proteazdır ve gıda proteinlerini parçalar. Rennin pepsine benzeyen bir proteaz olup; bütün memelilerin midesinde bulunmaktadır, süt endüstrisinde peynirin daha lezzetli hale getirilmesi veya lor peyniri yapımı amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Rani ve diğ., 2012).

Son zamanlarda hayvanlardan insanlara bulaşan hastalıkların görülme sıklığının artması sebebiyle özellikle gıda endüstrisinde kullanılan hayvansal kaynaklı proteazlar yerine mikrobiyal proteazların kullanımı yaygınlaşmıştır (Dhillon ve diğ., 2017).

1.3.3 Mikrobiyal proteaz üreticileri

Mikroorganizmalar sahip oldukları geniş çaplı biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik uygulamalara duyarlılıkları sebebiyle mükemmel enzim üreticileridir. Dünya genelinde enzim pazarının yaklaşık %40'ını mikrobiyal proteazlar oluşturmaktadır (Rao ve diğ., 1998).

Mikrobiyal proteazların birçoğu ekstraselülerdir, böylece bitkisel ve hayvansal proteazlara göre doğrudan fermantasyon ortamından alınıp yüksek miktarda saf enzim toplanarak ticari kullanımına yönelik işlemlerin yapılabilmesi daha kolaydır. Mikrobiyal proteaz enzim kaynaklarının çoğu bakteriler ve mantarlardır (Dhillon ve diğ., 2017).

1.3.3.1 Bakteriyal proteaz üreticileri

Ticari proteazların çoğu alkali veya nötraldir ve *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar tarafından üretilir. Bakteriyal nötral proteazlar kısıtlı pH aralığında (pH 5,0 – 8,0)

aktiftir ve ısıya toleransları düşüktür (Rao ve diğ., 1998). Nötraz, gıda endüstrisinde protein hidrolizatı olarak kullanılan bir nötral proteaz enzimidir. Alkalen proteazlar ise alkali pH'da optimal aktivite gösterirler ve ısıya oldukça dayanıklıdırlar. Bunlara örnek olarak, *Bacillus licheniformis* ve *Staphylothermus marinus* tarafından üretilen proteazlar verilebilir (Dhillon ve diğ., 2017).

1.3.3.2 Viral proteaz üreticileri

Viral proteazlar yeni antiviral ilaç ajanlarının geliştirilebilmesi için önemli hedeflerdir. Son 20 yılda yapılan çalışmalar, birçok virüsün bir veya daha fazla proteazı kodladığını göstermiştir. Bu enzimler viral proteinler veya öncü kapsitlerin olgunlaşması ve yeni viriyonların üretimi için gerekli katalitik aktiviteyi sağlarlar. Viral proteaz inhibitörlerinin klinik önemi, Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu (AIDS) hastalarının tedavisinde HIV proteaz inhibitörlerinin başarılı bir şekilde uygulanmasıyla gösterilmiştir. Üstelik proteaz ve ters transkriptaz inhibitörlerinden oluşan kombinasyon tedavisinin HIV enfeksiyonlarına karşı en etkili uygulama olduğu kanıtlanmıştır (Tong, 2002).

1.3.3.3 Fungal proteaz üreticileri

Fungal proteazlar çoğunlukla serin ve aspartik proteazlar üretiminde kullanılmaktadır (Sandhya ve diğ., 2005). Son yıllarda, birkaç farklı tipte substrat kullanılarak, su altından veya katı hal fermantasyonu yoluyla farklı proteaz tipleri üretme girişimleri olmuştur. Bunlara *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus* ve *Thermomyces*'den üretilen proteazlar örnek olarak verilebilir (De Souza ve diğ., 2015).

Fungal enzimler katı hal fermantasyonu sürecinde rahatlıkla kullanılabilir (Özdemir, 2018). Hayvansal kaynaklı bir enzim olan ve süt pıhtılaştırma işleminde görevli rennet enziminin, yapılan çalışmalar sonucunda *Mucor pusillus*'tan elde edilebildiği kanıtlanmıştır (Vapur, 2021).

Termofilik mantarlar, yüksek termostabilite ve yüksek hidroliz oranları gibi önemli özelliklere sahip hidrolaz enzimleri üretirler. Proteinlerin aminoasitlere ve peptitlere biyolojik dönüşümleri için 65 – 85 °C sıcaklık aralığında işlev gören termostabil

proteazlar, gıda, tekstil, deterjan ve ilaç endüstrilerinde başarılı uygulamalara sahiptir (De Souza ve diğ., 2015).

1.4 Mikrobiyal Kaynaklı Proteazların Üretimi ve Saflaştırılması

Önceki bölümlerde ifade edildiği üzere mikrobiyal proteazlar geniş kullanım alanına sahiptir, bu nedenle sıklıkla kullanılmaktadır. Literatürde farklı mikroorganizmalardan proteazların üretimi ve saflaştırılmasına yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Padmapriya ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada yeşil midyeden (*Perna viridis*) izole ettikleri *Bacillus sp.* suşlarını 37 °C'de 48 saat boyunca fermantasyon ortamında büyütmüşlerdir. Fermantasyon ortamından alkalen serin proteaz enzimini saflaştırmak üzere amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz ve ardından DEAE (dietilaminoetil) selüloz kolon kromatografisi uygulamışlardır. Saf haldeki proteaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 8,0 ve 70 °C olarak hesaplanmıştır. Molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 37 kDa hesaplanmıştır. Ayrıca enzim çözeltisine sürfaktan olarak %1 (h/h) Tween 80 eklendiğinde aktivitede %299 oranında artış tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada, *Lactobacillus fermentum* R6 izolatının 37 °C'de 48 saat boyunca pH 6,0'da fermente edilmesiyle elde edilen büyüme ortamından proteaz enzimi sırasıyla amonyum sülfat ile çöktürme, iyon değiştirme ve jel filtrasyon kromatografi uygulamalarıyla %17,5 verimle 23-kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonrası SDS-PAGE analiziyle karakterize edilen proteaz enziminin molekül ağırlığı 37,7 kDa olarak hesaplanmıştır. Saf enzim aktivitesinin Mn²⁺, Cu²⁺, EDTA ve PMSF varlığında tamamen inhibe edildiği gösterilmiştir. Çalışmada proteazın V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 58,2±1,42 mg/dak ve 17,3±0,85 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, SDS-PAGE analizi ile miyozin ağır zinciri, paramyozin, fosforilaz ve kreatin kinaz-M gibi miyofibrillar ve sarkoplazmik proteinleri hidrolize ettikleri gösterilmiştir (Sun ve diğ., 2020).

Mothe ve Sultanpuram (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise, proteaz enzimi *B. caseinolyticus*'dan saflaştırmış ve karakterize edilmiştir. Saflaştırma için %60'luk (a/a) amonyum sülfat ile çöktürme ve ardından DEAE selüloz kolon kullanılmıştır. Saf proteinin moleküler ağırlığı 66 kDa belirlenmiş olup, PMSF tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir. Substrat spesifite analizleri, kazeinin *B.*

caseinilyticus proteazı için en iyi substrat olduğunu göstermiştir. Enzim için optimal sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 60 °C ve 8,0 olduğu tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine farklı inhibitörlerin, metal iyonlarının, sürfaktanların ve oksitleyici ajanların (PMSF, EDTA, CuCl₂, ZnCl₂, NiCl₂, CoCl₂, NaCl, CaCl₂, FeCl₂, MgCl₂, hekzan, aseton, benzen, toluen, kloroform, Tween 20, H₂O₂ ve SDS) etkisi çalışılmıştır. Sonuçta enzimin farklı ajanlar varlığında da kararlılık gösterdiği bulunmuş olup içlerinde en çarpıcı örneğin EDTA varlığında gözlemlendiği (aktivitenin %96 arttığı) bildirilmiştir. Ayrıca çalışmada, organik çözücülerin aktivite üzerinde etkileri de araştırılmış; aseton, tolüen ve benzen gibi organik çözücülerin ortalama bir etki sağladığı ancak kloroformun enzim aktivitesini önemli ölçüde düşürdüğü rapor edilmiştir.

Proteaz enzim üretiminde kullanılan bir başka mikrobiyal kaynak *Aspergillus flavus*'tur. *A. flavus*'dan katı hal fermantasyonu kullanılarak enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim sırasında enzim üretim optimum koşulları; substrat olarak %3 (a/h) buğday kepeği, azot kaynağı olarak %3 (a/h) KNO₃ ve 3,0 mL'lik inokulum varlığında (10⁶ spor / mL), 30 °C sıcaklıkta, pH 4,0'te fermantasyonun gerçekleşmesiyle bulunmuştur. Saflaştırma sırasıyla %70'lik (a/a) amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE selüloz kolon kromatografisiyle (50 mM, pH 7,0 fosfat tamponu) gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma sonucunda molekül ağırlığı 46 kDa, optimum enzim aktivitesi ise 50 °C sıcaklıkta ve pH 7.0'de ölçülmüştür. Çeşitli metal iyonlarının (Zn⁺², Mg⁺², Ca⁺², Na⁺ ve Cu⁺²) enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırıldığında, Zn⁺² ve Cu⁺² metal iyonları varlığında enzim aktivitesinin arttığı, Na⁺ ve Ca⁺² varlığında ise enzim aktivitesinin büyük oranda düştüğü gözlemlenirken, özellikle Mg⁺²'nin kuvvetli bir proteaz inhibitörü olduğu bulunmuştur (Muthulakshmi ve diğ., 2011).

Başka bir mikrobiyal kaynaklı proteaz üreticisi olan *Neurospora crassa* (CGMCC308)'dan proteaz üretimi üzerine yapılan bir çalışmada ise substrat olarak okara (soya fasülyesi küspesi) kullanılarak katı hal fermantasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimum fermantasyon koşulları; 10 mg okara ve 21 mL su varlığında 2 mL inokulum kullanılarak pH 5,0'te, 30 °C, ve 72 saatlik fermantasyon süresinde gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon sıvısından proteaz enziminin saflaştırılması amonyum sülfat çöktürme ardından sırasıyla DEAE Sefaroz ve Sephadex G-75 kolon kromatografileri kullanarak gerçekleştirilmiş ve enzim %31'lik bir geri kazanımla

yaklaşık 28,27 kat saflaştırılmıştır. Saf enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 30 kDa olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 55 °C ve 9,0 olarak hesaplanmıştır. Organik çözücülerin, sürfaktan, metal iyonları ve inhibitörlerin proteaz aktivitesine etkisi araştırılmış; enzim aktivitesinin SDS ve metaller tarafından kısmen inhibe edildiği, organik çözücülerden ise çok az etkilendiği vurgulanmıştır. Metal iyonu olarak 5 mM konsantrasyonunda Ca^{+2} kullanıldığında enzim aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. %10 (h/h) derişimde metanol, etanol veya aseton varlığında proteaz aktivitesinin sadece %1 – %3 oranında inhibe olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, enzim PMSF varlığında tamamen inhibe olmuştur (Zheng ve diğ., 2020).

Mikrobiyal kaynaklı proteazlar üzerinde bir çok çalışma yapılmıştır bunlardan biri de *Halogeometricum borinquense* (TSS101)'den proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine Vidyasagar ve diğ.,'in 2006'da yapmış oldukları çalışmadır. Saflaştırılan proteaz enzimin 90°C'ye kadar dayanıklı olduğu, optimum pH'sı 10,0 olarak bulunmuştur. Yapılan karakterizasyon çalışmalarında serin proteaz inhibitörü PMSF varlığında saflaştırılan enzimin neredeyse tamamen inaktive olduğu bu sebeple saflaştırılan enzimin serin proteaz olduğu sonucuna varılmıştır. SDS-PAGE yöntemiyle proteazın ağırlığı 86 kDa olarak hesaplanmıştır.

1.5. ATPS (Aqueous Two Phase Partitioning System / Sulu İkili Faz Ayırma Sistemi)

Sulu ikili faz sistemleri, proteinlerin izolasyonu ve saflaştırılmasında sıklıkla kullanılan kromatografik olmayan yöntemlerden biridir. İlk kez Albertsson tarafından uygulanan bu sistem ile biyomoleküllerin fazlar arasında seçici olarak dağılım gösterebildikleri ortaya konmuştur (DiLallo ve Albertson, 1961).

Basit ve çevreye zararsız olan bu teknik (her iki fazda da %80'den fazla su bulunur), denatürasyona nadir sebep olan hızlı ayırma (uçucu organik bileşenler kullanılmaz), hızlı kütle transferi (düşük ara yüzey gerilim), seçici ayırma (yakınlık bölümü) ve kolay ölçeklendirme sağlar (Albertsson, 1986). Bu nedenle ATPS, proteinlerin, enzimlerin, biyofarmasötiklerin ve ekstraktif fermantasyonun geri kazanılması gibi biyoteknolojinin çeşitli alanlarında uygulanmaktadır (Iqbal ve diğ., 2016).

Genel olarak, polimer / polimer (ör. Polietilen glikol / Dekstran) ve polimer / tuz (ör. Polietilen glikol / fosfat) sistemi olmak üzere iki farklı ATPS çeşidi vardır. Polimer /

polimer sistemi İki farklı suda çözünür polimerin suda karıştırılmasıyla oluşturulurken Polimer / Tuz sistemi ise tuzun suda karıştırılmasıyla oluşturulur. Her iki sistemde de sisteme eklenen bileşikler sınırlayıcı konsantrasyonları aştığında, iki karışmaz sulu faz meydana gelir (Albertsson, 1986). Sınırlayıcı konsantrasyonlar, faz oluşturan bileşenlerin tipine ve çözeltinin pH'sına, iyonik gücüne ve sıcaklığına bağlıdır (Raja ve diğ., 2011). Polimer / Polimer sistemi olarak en çok tercih edilen PEG / Dekstran olup daha çok küçük ölçekte biyomoleküllerin ayrılmasında kullanılır. PEG / Tuz sistemleri ise büyük ölçekte ihtiyaç duyulan ayırmalarda tercih edilir. Her iki sistemi karşılaştırdığımızda PEG / Tuz sistemleri diğerine göre düşük vizkozite içeriği ve ekonomik olması sebebiyle daha avantajlıdır (Yücekan, 2008).

ATPS'nin kromatografiye karşı bazı üstün özellikleri bulunmaktadır. Örneğin, ilgilenilen proteine tek basamakta hem saflaştırma hem de konsantre edilme olanağı sunar. Ayrıca büyük ölçekte uygulanabilme potansiyeli sunmasının yanı sıra minimum protein degradasyonu (düşük ara yüzey gerilim sebebiyle), zamandan tasarruf sağlama, düşük enerji tüketimi ve yüksek verimde çalışma gibi avantajlar sağlamaktadır (Yücekan, 2008).

Sulu iki fazlı sistemlerde bir proteinin fazlar arasında seçici ayrımını sağlayan faktörler;

- (i) polimerlerin moleküler ağırlıkları/boyutu,
- (ii) polimer konsantrasyonu,
- (iii) tuzun iyonik gücü,
- (iv) pH ve
- (v) sistemin hidrofobik çözünürlüğünü artıran NaCl gibi kullanılan tuz

şeklinde tanımlanır (Asenjo ve Andrews, 2012).

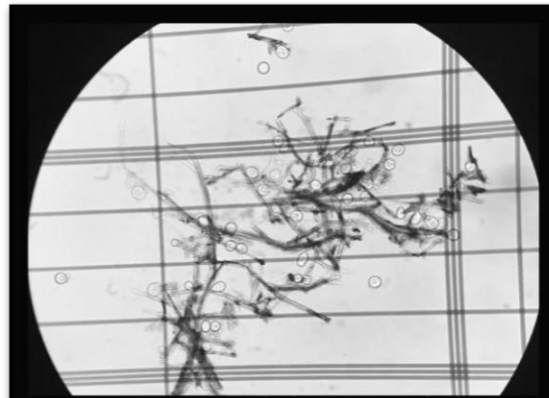
1.6. *Scytalidium thermophilum*

Termofilik mantarlar yeryüzünde bulunan ökaryotik canlılar içinde ısıya en fazla dayanıklı olanlarıdır. Optimum büyüme sıcaklıkları genellikle 45 °C, üreyebildikleri maksimum sıcaklık ise genellikle 65 °C'dir. Termotolerant mantarların aksine, termofilik mantarlar 20 °C'nin altındaki sıcaklıklarda üreyemezler (Cooney ve

Emerson, 1966). Lignoselülozik biyokütlenin doğal geri kazanımı sürecinde ve kompostlama gibi işlemler esnasında meydana gelen biyolojik faaliyetlerin sonucu olarak ısınan ortamlar termofilik mantarların yaşam alanlarının başında gelmektedir. Bu nedenle, termofilik mantarlar, özellikle lignoselülozik biyokütlenin parçalanmasında rol oynayan enzimler açısından oldukça zengindirler. Bu enzimlerin en önemli özellikleri termostabil olmaları ve çoğunlukla nötral ve alkalın pH da aktivite göstermeleridir (Tuomela, 2000). Literatürde termofilik mantarların endüstriyel öneme sahip enzimleri üzerine yayınlar mevcut olmakla beraber bu canlıların biyolojileri üzerine çok sınırlı miktarda araştırma bulunmaktadır. Örneğin, sıcağa adaptasyonlarının moleküler mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca, kompost ortamındaki enzimatik ve biyolojik faaliyetleri hakkında yapılmış ayrıntılı çalışmalar da oldukça az sayıdadır. Özellikleri itibarı ile termofilik mantarların mezofilik mantarlardan evrimleştikleri düşünülmektedir (Feofilova ve Tereshina, 1999). Bu açıdan, kendi ekolojik nişleri içinde, ortamdaki ısınma sürecini aşmış ve buna adapte olabilmiş ökaryotik canlılar olarak termofilik mantarlar araştırılması gereken organizmalardır.

Scytalidium thermophilum, kültür mantarı *Agaricus bisporus* üzerinde indükleyici etkiye sahip bir mantardır. Kompostlama sonrasında uygulanan 55 °C'lik pastörizasyon işlemi sırasında serpilten *S. thermophilum*'un üremesi kültür mantarının verimi açısından gereklidir (Straatsma ve diğ., 1994). *S. thermophilum*'un optimum üreme sıcaklığı 45 °C'dir (Ögel ve diğ., 2006).

Şekil 1.3'de *S. thermophilum*'un sporları, Tablo 1.4'te taksonomik olarak sınıflandırması gösterilmiştir.



Şekil 1.3. *S.thermophilum* sporları

Tablo 1.4. *S. thermophilum*'un taksonomik sınıflandırılması

Takson	Bilimsel sınıflandırma
Alem	Fungi
Şube	Ascomycota
Alt Şube	Pezizomycotina
Sınıf	Sordariomycetes
Alt Sınıf	Sordariomycetidae
Takım	Sordariales
Aile	Chaetomiaceae
Cins	<i>Scytalidium</i>
Tür	<i>Scytalidium thermophilum</i>

2. MALZEME VE YÖNTEMLER

2.1. Malzemeler

2.1.1. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich (Almanya), Merck (Almanya), NeoFroxx (Almanya), Exim Yaşam Bilimleri (Türkiye), Tekkim (Türkiye) ve AS Teknolojik Sistemler (Türkiye) firmalarından temin edildi.

2.1.2. Mikroorganizma

Proteaz üretiminde kullanılan *Scytalidium thermophilum* (ATCC no: 16454) (alt kültürü *Humicola insolens*), Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ (Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi) tarafından sağlandı.

2.2. Yöntemler

2.2.1. *Scytalidium thermophilum*'dan proteaz üretimi

S. thermophilum'a ait spor süspansiyonlarını hazırlamak için inokulum, YpSS (Yeast Powder Soluble Starch) Agarda beş gün boyunca 45 °C'de büyütüldü. Agar üzerinde gelişen sporlar 30 mL'lik steril %0,01 (h/h) Tween 80 içeren çözelti içine alındıktan sonra spor sayımı Petroff – Hausser Lamı kullanılarak gerçekleştirildi. (Garay-Flores ve diğ., 2014). Daha sonra spor süspansiyonları steril Tween 80 içeren çözelti ile mL'sinde bir milyon spor içerecek şekilde seyreltildi ve %80 (h/h) gliserol eklenerek -80 °C'de muhafaza edildi.

S. thermophilum 'un büyütme işlemleri için küfe ait 100 µL'lik spor süspansiyonu (10^6 spor / mL), öncü büyüme ortamı olarak hazırlanan 50 mL'lik %1 (a/h) glukoz içeren besiyerinde canlandırıldı (Hasbay Ifrij ve Ögel, 2002). 24 saat sonra ön kültür 2 L'lik erlenlerin içinde hazırlanan 1 L'lik (glukoz 4,0 g/L; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g/L, K₂HPO₄, 1 g/L; maya ekstraktı, 10 g/L) besiyerine aktarıldı ve 155 rpm'de 10 gün süresince inkübasyona bırakıldı.

Fermantasyon koşullarının (fermantasyon süresi, glukoz konsantrasyonu, azot kaynağı ve konsantrasyonu, metal iyonu ve konsantrasyonu) proteaz üretimi üzerini etkilerini belirlemek üzere fermentasyon ortamından her 24 saatte bir örnekler toplanarak hücreler Whatmann No. 1'den süzüldü ve süzüntü 15 dak boyunca 6500 rpm'de santrifüjlendi. Hücreden arındırılmış süpernatant, "ham ekstrakt" olarak isimlendirildi ve hücre dışı proteaz aktivitesini belirlemek için kullanıldı.

2.2.1.2. Fermantasyon süresi

Fermantasyon süresinin proteaz üretimi üzerine etkisini araştırmak üzere 10 gün boyunca büyütülen örneklerden yukarıda açıklandığı gibi gün aşırı 2 mL fermentasyon sıvısı toplandı (Hasbay Ifrij ve Ögel, 2002) ve proteaz aktivite ölçümü (Bdewe, 2020) gerçekleştirildi.

2.2.1.2. Glukoz konsantrasyonu

Karbon kaynağı olarak kullanılan glukoz büyüme ortamına farklı konsantrasyonlarda (%1 – 4 a/h) eklendi. 45 °C ve 155 rpm'de gerçekleşen üç günlük inkübasyon boyunca beş mL olarak toplanan örnekler 6000 rpm'de 30 dak boyunca santrifüj edildi ve ham ekstrakt toplandı (İbrahim ve diğ., 2015).

2.2.1.3. Azot kaynağı ve konsantrasyonu

Farklı azot kaynaklarının proteaz enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak üzere maya ekstraktı, pepton, et ekstraktı ve yağsız süt kullanıldı. Her bir azot kaynağı için %0,2 – 1 (a/h) arasında değişen farklı konsantrasyonlarda büyüme ortamları hazırlandı. 45 °C ve 155 rpm'de üç gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreden arındırılmış ham ekstrakt toplanarak proteaz aktivite ölçümü yapıldı (Asha ve Palaniswamy, 2018).

2.2.1.4. Metal iyonu ve konsantrasyonu

Metal iyonlarının proteaz enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak üzere MgCl₂, MgSO₄, KCl, NaCl ve CaCl₂ tuzları farklı konsantrasyonlarda (2 mM, 5 mM ve 10 mM) büyüme ortamına eklendi ve üç gün boyunca 45 °C ve 155 rpm'de inkübe edildi.

Daha sonra hücreden arındırılmış ham ekstrakt toplanarak proteaz aktivite ölçümü yapıldı (Mothe ve Sultanpuram, 2016).

2.2.2. Proteaz aktivite tayini

%1 (a/h) oranında hazırlanan kazein çözeltisi 30 dak boyunca 60 °C’de yavaşça karıştırılarak inkübe edildi. Reaksiyon ve kör sıvısına 0,8 mL %1’lik kazein eklendi. Reaksiyon sıvısına 0,2 mL enzim eklendi (kör sıvısı enzim içermemektedir). 30 dak boyunca 60 °C’de su banyosunda inkübasyona bırakılan örnekler daha sonra 1 mL TCA ile muamele edildi ve reaksiyon durduruldu. Örnekler 10 – 15 dak boyunca buz içerisinde bekletildi. Bekleyen örnekler 20 dak boyunca 9500 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüjün ardından tüplerdeki ham ekstrakt toplandı ve 280 nm’de 60 °C’ye ayarlanan spektrofotometrede enzim aktivite ölçümü yapıldı (Bdewe, 2020). Enzim aktivitesi tayin yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması Ek-A’da verilmiştir. Proteaz enzim aktivite hesabı Eşitlik (2.1)’de verilen denklem kullanılarak hesaplandı;

$$\text{Proteaz enzim aktivitesi} = \frac{280 \text{ nm'de okunan absorbanans değeri}}{0,01 \times 30 \times 0,2} \quad (2.1)$$

0,01: Sabit (280 nm’de absorbansta beklenen birim artış değeri)

30: Reaksiyon Süresi

0,2: Enzim Miktarı (mL)

Bir birim proteaz aktivitesi (1 U); dakikada 280 nm’de absorbansta 0,01 birim artış için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Bdewe, 2020).

2.2.3. Protein miktar tayini

Enzim örneklerindeki protein miktarı Bradford Metodu (Bradford, 1976) kullanılarak ölçüldü. Metoda göre Comassie Brilliant Blue G-250 boyasının vermiş olduğu absorbanans değerine (595 nm) bakılırken, BSA (Sığır Serum Albumin) standart protein olarak kullanıldı.

Hazırlanan 100 µL’lik standart BSA solüsyonlarına (0,1 mg/mL – 1,5 mg/mL) 1,5 mL Bradford boyası eklenerek sırasıyla seyreltildi. 10 – 15 dak boyunca bekletilen örneklerin 595 nm’de absorbanans değeri ölçüldü ve standart protein grafiği (Şekil C.1)

oluşturuldu. Hazırlanan standart grafik kullanılarak örneklerin protein miktarı hesaplandı.

2.2.4. *S. thermophilum* proteazının sulu ikili faz sistemiyle saflaştırılması

S. thermophilum proteazının sulu ikili faz sistemiyle saflaştırılmasında optimum fermantasyon koşullarında üretilen ham ekstrakt kullanıldı. Sulu ikili faz sistemi olarak ise büyük ölçekte uygulanabilir ve maliyetinin daha düşük olması sebebiyle Polimer / Tuz sistemi seçilerek sistem parametreleri (sistem pH, PEG molekül ağırlığı, PEG konsantrasyonu, sodyum sitrat konsantrasyonu ve kosolüt (NaCl) miktarı) optimize edildi.

2.2.4.1. Sistem pH'sı ve PEG molekül ağırlığının belirlenmesi

Stok polietilen glikol (PEG) (%50, a/a) ve sodyum sitrat (%30, a/a) çözeltileri distile su ile hazırlandı. 50 mL'lik tüplere farklı molekül ağırlıklarına (1000, 3000, 4000, 6000 ve 8000, g/mol) sahip PEG'ler eklendi. Hazırlanan sistemin pH'sı (6,0; 7,0 ve 8,0) NaOH ve HCl yardımıyla ayarlandı. Sistemin ağırlığı 10 gr olarak belirlendi ve içerisine sistem ağırlığının %20'si (a/a) olacak şekilde ham ekstrakt (süpernat) eklendi. Bir dakika boyunca vortekslenen karışım bir saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi ve ardından oluşan fazlar 'alt faz' ve 'üst faz' olmak üzere farklı tüplere toplandı (Fernandes ve diğ., 2020).

2.2.4.2. PEG konsantrasyonunun belirlenmesi

En uygun PEG molekül ağırlığı ve sistem pH'sının belirlenmesinin ardından sistem içerisindeki PEG konsantrasyonu belirlemek üzere sistemin tuz (sodyum sitrat) konsantrasyonu %15 (a/a) olarak sabit tutuldu ve sisteme farklı konsantrasyonlarda PEG (%10, 12,5, 15, 17,5 ve %20 a/a) eklendi (Alhelli ve diğ., 2016).

2.2.4.3. Sodyum sitrat konsantrasyonunun belirlenmesi

PEG konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından uygun PEG konsantrasyonu sabit tutularak sistem içerisine farklı oranlarda (%10, 12,5, 15, 17,5 ve %20, a/a) sodyum sitrat eklendi ve saflaştırma katsayısı en yüksek olan tuz konsantrasyonu seçildi (Işık, 2018).

2.2.4.4. NaCl konsantrasyonunun belirlenmesi

Sistem içerisine belirlenen oranlarda PEG ve sodyum sitrat eklenmesinin ardından sistem için en uygun NaCl miktarını belirlemek amacıyla sisteme farklı oranlarda (%1, 2, 3, 5, 7, 10 ve 12, a/a) NaCl eklendi (Amid ve diğ., 2012).

2.2.4.5. Saflaştırma parametrelerinin belirlenmesi

Sulu ikili faz sistemi *Scytalidium* proteazının, saflaştırma katsayısı, dağılım katsayısı ve spesifik aktivitesine göre değerlendirildi. Tüm saflaştırma parametrelerinin eşitlikleri (Eşitlik (2.2), (2.3), (2.4)) aşağıda verilmektedir (Lario ve diğ., 2016);

Spesifik aktivite (SA)

Proteaz enzim aktivitesinin (U/mL), protein miktarına oranıdır;

$$SA = \text{Bir fazdaki enzim aktivitesi} / \text{o fazdaki protein miktarı} \quad (2.2)$$

Saflaştırma katsayısı (PF)

Bir fazdaki spesifik aktivitenin, ham ekstraktın spesifik aktivitesine oranıdır;

$$PF = SA_{\text{alt}} / SA_{\text{HE}} \quad \text{veya} \quad PF = SA_{\text{üst}} / SA_{\text{HE}} \quad (2.3)$$

Proteaz enziminin geri kazanımı (%GK)

Bir fazdaki proteaz enzim aktivitesinin sisteme eklenen ham ekstraktının proteaz aktivitesine oranıdır;

$$\%GK = \text{Alt veya üst fazdaki enzim aktivitesi} / \text{sisteme ilave edilen ham ekstraktın aktivitesi} \quad (2.4)$$

2.2.5. *S. thermophilum*'dan proteaz enziminin kromatografi ile saflaştırılması

ATPS ile saflaştırılan *S. thermophilum* proteazının saflaştırma verimini karşılaştırmak üzere ham ekstrakta iyon değişim kromatografisi uygulandı. Buna göre, *S. thermophilum*'dan proteaz enzimi elde etmek amacıyla optimum koşullarda elde edilen ham ekstrakt toplandı.

Saflaştırma AktaPrime FPLC (GE Healthcare, Amerika) kullanılarak yapıldı. 20 mL'lik HiPrep Q XL (16/10) kolonuna (anyon değiştirici, GE Healthcare) 200 mL ham ekstrakt yüklendi. Yükleme öncesi kolon 50 mM Tris – HCl (pH 8,0) tampon çözeltisi ile dengelendi. Yükleme sonrası yine aynı tampon çözelti ile 2 mL/dak akış hızında yıkandı. Kolona tutunmuş olan proteinlerin kolondan uzaklaştırılmasında 500 mM NaCl içeren 50 mM Tris – HCl (pH 8,0) kullanıldı. Kolondan uzaklaştırılan protein örnekleri 3 mL hacmindeki fraksiyonlarda toplandı. Her bir fraksiyonda proteaz aktivite ve protein miktar tayini sırasıyla bölüm 2.2.2 ve 2.2.3'de açıklanan şekilde gerçekleştirildi. Yüksek proteaz aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek 50 mM Tris – HCl (pH 8,0) tampon çözeltisine karşı +4 °C'de bir gece boyunca diyaliz edildi. Diyalizat 0.22 µm'lik filtreden geçirildikten sonra proteaz aktivite ve protein miktar tayinleri sırasıyla bölüm 2.2.2 ve 2.2.3'de açıklanan şekilde gerçekleştirilerek daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırıldı.

2.2.6. *S. thermophilum* proteaz enziminin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez analizi

Enzim preparatına sırasıyla ATPS ve iyon değişim kromatografisi uygulamalarının ardından saflılığının kontrolü için Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi uygulandı (Laemmli, 1970).

Elektroforez, Bio-Rad Mini-Protean sistemiyle yapıldı. Jel için %5 (h/h)'lik yükleme jeli; (1 M Tris-HCl, pH 6,8; %30 (h/h) akrilamid; %20 (a/h) SDS, %10 (a/h) Amonyum per sülfat (APS), TEMED), %15 (h/h)'lik ayırma jeli (%30 (h/h) akrilamid, 1,5 M Tris-HCl, %20 (a/h) SDS, %10 (a/h) APS, TEMED) hazırlandı. Protein indirgeyici ajan olarak β-Merkaptoetanol kullanıldı ve örnekler 10 dak boyunca 100 °C'de denatüre edildi. Prestained Protein Sharpmass VII Protein MW, 6,5 – 270 kDa markörü kullandı. Örnekler Bio-Rad Mini-Protean sistemine yüklendi. Yüklenen örnekler 200 V'da yaklaşık 1 saat boyunca yürütüldü. Elektroforez sonrası jel Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama yöntemi (Ek-B) ile boyanarak protein bantları görüntüledi.

2.2.7. *S. thermophilum* proteazının kısmi karakterizasyonu

2.2.7.1 Optimum sıcaklık değerinin ve termal kararlılığın belirlenmesi

Protein moleküler yapısına sahip enzimlerin katalitik aktiviteleri çevresel koşullara karşı oldukça duyarlıdır. Yüksek sıcaklıklar enzimin denatüre olmasına sebep olur ve buna bağlı olarak aktivitede düşüş gözlemlenebilir (Karkas, 2009). Enzimin optimum reaksiyon gösterdiği sıcaklık değeri, reaksiyon sıcaklığı ve enzim bağıl aktivitesi arasında çizilen grafik yardımıyla belirlendi. Yüzde bağıl aktivite değeri, farklı sıcaklıklarda ölçülen enzim aktivitesinin maksimum enzim aktivitesine oranının 100 ile çarpılmasıyla hesaplandı.

Proteaz aktivite tayini, enzimin sıcaklığa bağıllığını gözlemlemek amacıyla 30 °C - 80 °C (30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C) aralığında değiştirilerek ölçüldü (Fernandes, 2020). Her bir sıcaklık değeri için iki örnek ve bir kör deneme yapıldı.

Aynı miktarda protein içeren örnekler enzimin termal kararlılığının belirlenmesi amacıyla 30 °C – 80 °C arasında (30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C) değişen sıcaklıklarda su banyosu kullanılarak bir saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası standart koşullarda enzim aktivite tayini yapıldı ve enzimin en kararlı olduğu sıcaklık değeri belirlendi. Yüzde bağıl aktivite değeri, ısıl işlem görmüş enzim aktivitesinin ısıl işlemden önce ölçülen aktiviteye oranının 100 ile çarpımına eşittir. Her bir sıcaklık için örnekler çift çalışıldı.

2.2.7.2. Optimum pH değerinin ve pH kararlılığının belirlenmesi

Hem reaksiyon pH değeri hem de pH kararlılık deneyi belirlenen optimum reaksiyon sıcaklığında (60 °C) gerçekleştirildi. *S. thermophilum* proteazının en yüksek enzimatik aktiviteyi verdiği pH reaksiyon değerinin bulunması amacıyla farklı pH değer aralıklarında (pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0) tampon çözelti hazırlandı. Reaksiyon pH'sı ve enzim bağıl aktivitesi arasında çizilen grafik yardımıyla enzim için optimum pH reaksiyon değeri belirlendi. Yüzde bağıl aktivite değeri, farklı pH'larda ölçülen enzim aktivitesinin maksimum enzim aktivitesine oranının 100 ile çarpılmasıyla hesaplandı. Her bir pH değeri için iki örnek ve bir kör deneme yapıldı.

Enzimin pH kararlılığının belirlenmesi için ise enzim çözeltisi farklı pH aralıklarında (pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0) hazırlandı ve bir saat boyunca inkübe edildi. pH 4,0 – 5,0 arasındaki reaksiyonlar için 100 mM sitrat tampon çözeltisi, pH 6,0 ila 7,0 için 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi, pH 8,0 için 100 mM tris tampon çözeltisi ve

pH 9,0 için 100 mM glisin sodyum hidroksit tampon çözeltileri kullanıldı. İnkübasyonun ardından standart koşullarda enzim aktivite deneyi yapıldı ve enzimin en kararlı olduğu pH değeri belirlendi. Yüzde bağıl aktivite değeri, farklı pH'larda inkübe edilmiş enzim aktivitesinin inkübasyondan önce ölçülen aktiviteye oranının 100 ile çarpımına eşittir. Her bir deneme çift çalışıldı.



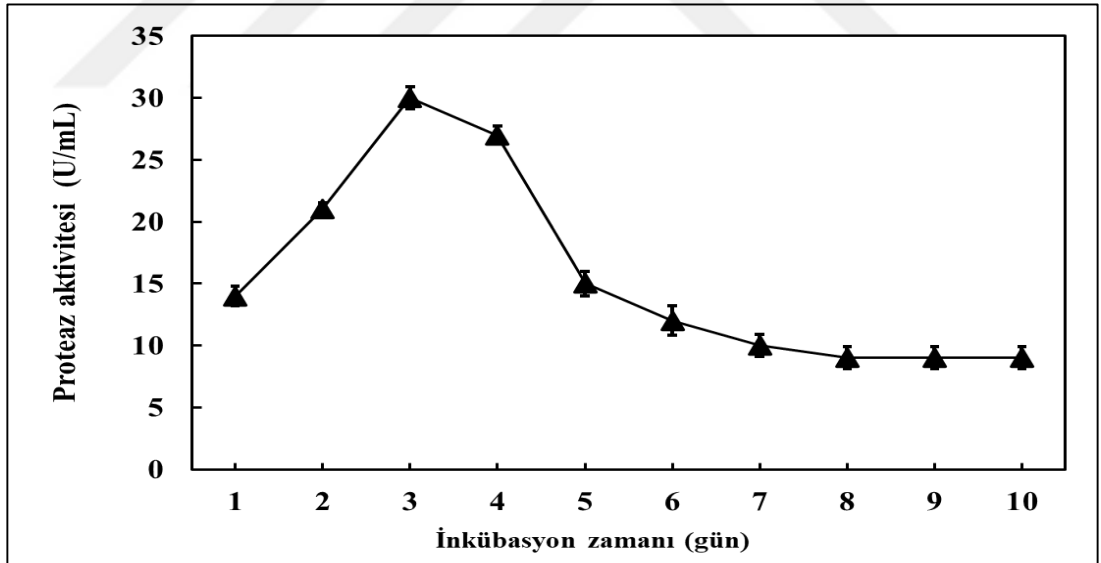
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. *S. thermophilum* 'dan Proteaz Üretiminin Optimizasyonu

3.1.1. İnkübasyon zamanının optimizasyonu

S. thermophilum'dan maksimum proteaz üretimi için öncelikle inkübasyon süresi optimize edildi. Bunun için hücre dışı proteaz aktivitesi %1 (a/h) glukoz içeren ortamda 10 gün süreyle ölçüldü (Şekil 3.1). Maksimum proteaz üretimi, *S. thermophilum*'un üçüncü gününde gözlemlendi.

Buna göre sonraki optimizasyon çalışmalarında proteaz aktivite ölçümleri için *S. thermophilum* büyümesinin üçüncü gününden toplanan hücreden arındırılmış ham ekstrakt kullanıldı.



Şekil 3.1. *S. thermophilum*' un zamana karşı proteaz aktivite (U/mL) grafiği

Proteazlar birçok canlıdan elde edilmektedir. Üretim için gerekli inkübasyon süresicanlıdan canlıya farklılık göstermektedir. Mikrobiyal kaynaklı proteazın üretim periyodu 12 saat ile 12 gün arasında oldukça değişken bir aralıktadır. Çalışmada yapılan 10 günlük inkübasyon periyodunun sonunda en yüksek proteaz aktivitesi üçüncü günde gözlemlenmiş olup elde edilen sonuç *S. thermophilum* ile daha önce çalışan

Hasbay Ifrij ve Ögel'in (2002) sunduğu bulgular ile benzerlik göstermektedir. Başka bir örnek olarak ise Ul-Haq ve diğ. (2006)'nin *Penicillium chrysogenum* ile yaptıkları çalışma verilebilir; burada optimum inkübasyon gününü bu çalışmaya benzer şekilde üçüncü gün olarak tespit etmişlerdir. Bu örneklerden farklı olarak; *Aspergillus funiculosus*'tan proteaz üretimi için optimum inkübasyon süresi beşinci gün bulunurken (Shumi, 2004), *Lactobacillus fermentum* R6 izolatıyla yapılan çalışmada inkübasyon zamanının 48 saat olduğu tespit edilmiştir (Sun ve diğ., 2020). Besiyerinin içeriği, pH ve sıcaklık gibi faktörlerin yanı sıra türler arası farklılıklar da inkübasyon süresinde değişime sebep olabilmektedir (Sooch ve diğ., 2014).

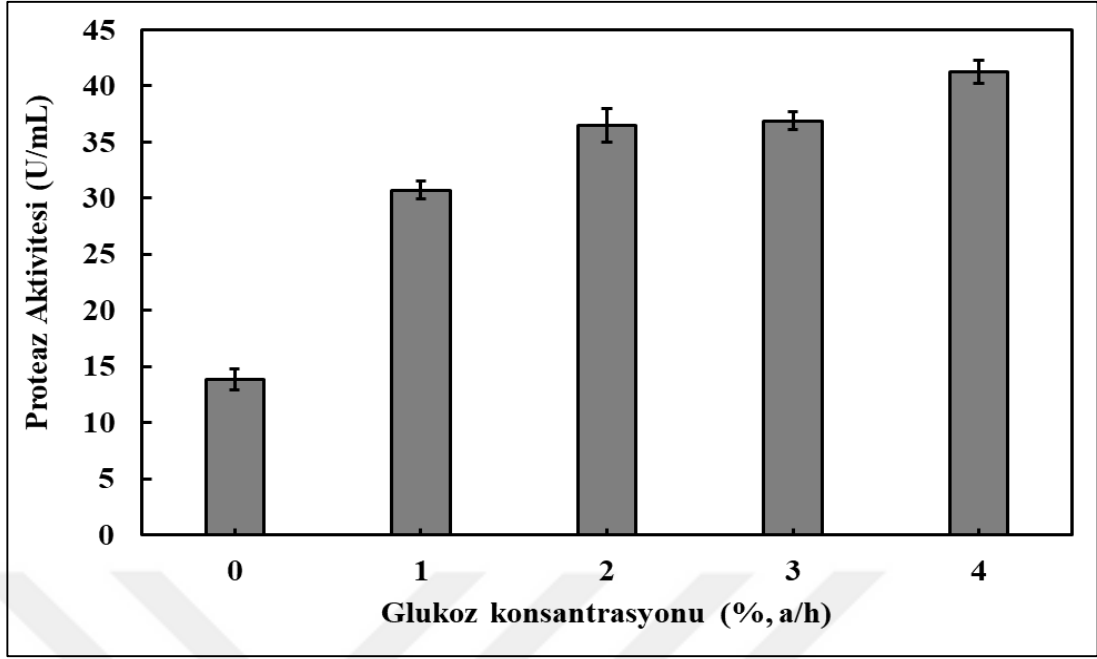
3.1.2. Glukoz konsantrasyonunun optimizasyonu

Hasbay Ifrij ve Ögel (2002) tarafından öne sürülen bulgulara göre *S. thermophilum*'dan hücre dışı proteaz enzimi için en uygun karbon kaynağı glukozdur. Bu bilgi dikkate alınarak çalışmada karbon kaynağı olarak glukoz tercih edildi. Glukoz konsantrasyonunun optimizasyonu için %1 ile %4 (a/h) oranlarında büyüme ortamına eklenerek *S. thermophilum* büyümesinin üçüncü gününde (bir önceki deneysel bulguya göre) proteaz aktivite ölçümleri yapıldı.

Üçüncü günde yapılan proteaz aktivite tayininin sonuçları Şekil 3.2'de verilmiştir. Şekil 3.2.'de görüldüğü üzere en yüksek proteolitik aktivite %4 (a/h) glukoz varlığında ölçüldü. Bu nedenle, sonraki optimizasyon deneyleri %4 (a/h) glukoz içeren büyüme ortamında gerçekleştirildi. %4 (a/h)'ün üzerinde çalışılmamasının başlıca sebebi ekonomik açıdan maliyeti yükseltmesi, dolayısıyla çalışma amaçlarından biri olan *S. thermophilum*'dan proteaz enziminin düşük maliyette üretimini sınırlamasıdır.

Literatür araştırması yapıldığında büyüme ortamına *S. thermophilum*'dan katalaz enziminin optimum üretimi için büyüme ortamına %4 (a/h) glukoz eklendiğine dair rapor bulunmaktadır (Ögel ve diğ., 2006).

Diğer taraftan, bu çalışmada ölçülen proteaz aktivitesinin, Hasbay Ifrij ve Ögel (2002) tarafından aynı mikroorganizma düşük glukoz konsantrasyonda ölçülen aktiviteden (yaklaşık 2,2 U/mL) 19-kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

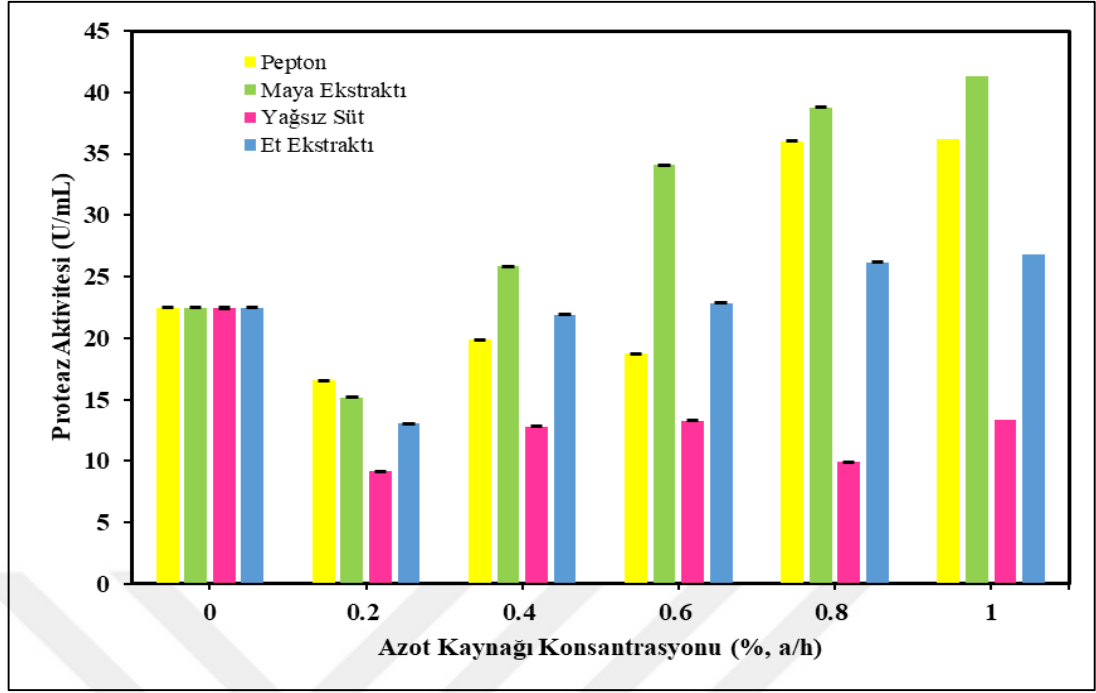


Şekil 3.2. *S. thermophilum*'un glukoz konsantrasyonuna (% a/h) karşı proteaz aktivite (U/mL) grafiği

3.1.3. Azot kaynağının ve konsantrasyonun enzim aktivitesine etkisi

S. thermophilum'dan proteaz üretimi için inkübasyon süresi ve glukoz (karbon kaynağı) konsantrasyonunun optimizasyonu sonrası optimum azot kaynağı ve konsantrasyonunu belirlemek üzere büyüme ortamına farklı konsantrasyonlarda (%0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1, a/h) et ekstraktı (beef extract), maya ekstraktı (yeast extract), pepton ve yağsız süt (skimmed milk) eklendi. Üç günlük inkübasyonun sonucunda en yüksek enzim aktivitesinin %1 (a/h) maya ekstraktı içeren besiyerinde olduğu görüldü (Şekil 3.3). Maya ekstraktını, pepton ve et ekstraktının izlediği görülürken en düşük proteolitik aktivite yağsız süt içeren büyüme ortamından toplanan ham ekstrakt örneğinde gözlemlendi (Şekil 3.3).

Literatürde yer alan çalışmalarla karşılaştırıldığında mantar kaynağına bağlı olarak farklı azot kaynaklarında optimum proteolitik aktivite gözlemlenmiştir. Örneğin, bu çalışmaya benzer şekilde *Alternaria alternata* küf mantarında yapılan azot kaynağı çalışması en yüksek proteaz aktivitesinin %1 (a/h) maya ekstraktında gözlemlendiğini göstermektedir (Rajput, 2016). Diğer taraftan, *Aspergillus niger*'da proteaz üretimi için en uygun azot kaynağı %1 (a/h) pepton olarak tanımlanmıştır (Kamath ve diğ., 2010).



Şekil 3.3. *S. thermophilum*'un azot kaynağı ve konsantrasyonuna (% a/h) karşı proteaz aktivite (U/mL) grafiği

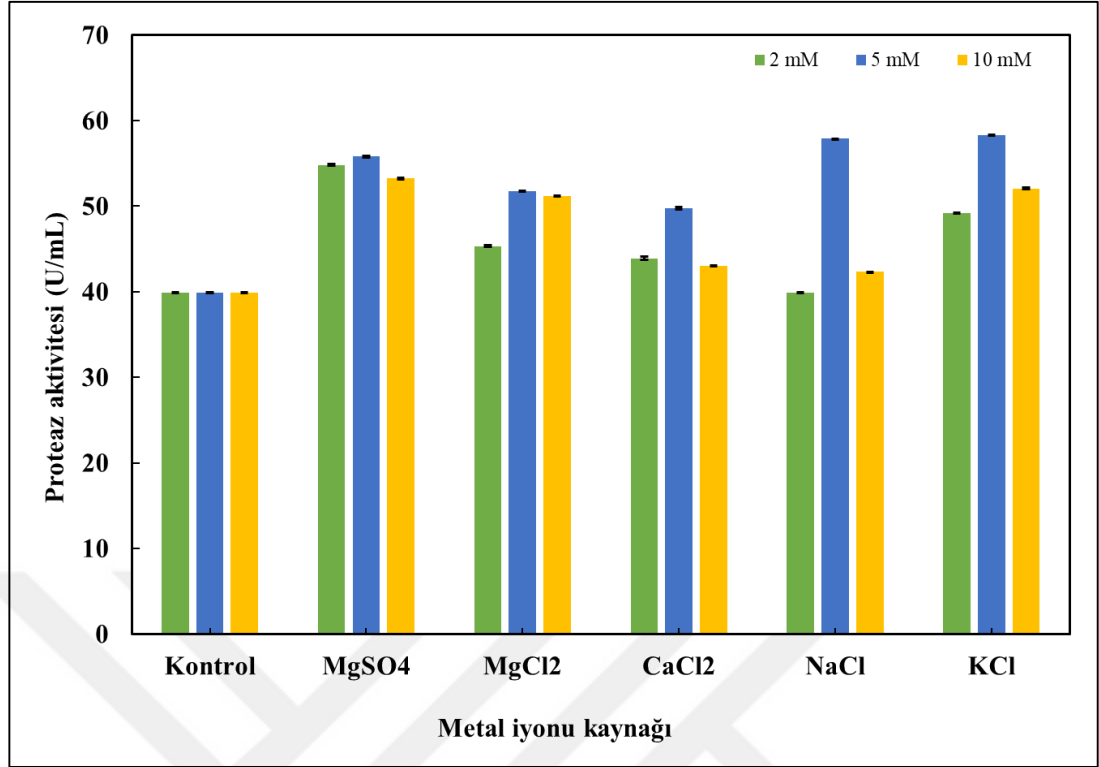
Şekil 3.3.'de görüldüğü üzere azot kaynağı konsantrasyonundaki artış proteaz aktivitesini olumlu yönde etkilemiştir. Ancak, literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde çoğunlukla konsantrasyonun % 1 (a/h) üzerine çıkılmadığı görülmüştür (Uyar ve diğ., 2011). Bu sebeple bu çalışmada da % 1'in (a/h) üzerine çıkılmadı.

3.1.4. Metal iyonu ve konsantrasyonun enzim aktivitesine etkisi

Büyüme ortamdaki metal iyonları, indükleyici olarak enzim üretimini etkileyen önemli bir faktördür. Bu nedenle, proteaz aktivitesini uyarmak üzere *S. thermophilum*'un büyüme ortamına $MgSO_4$, $MgCl_2$, KCl , $NaCl$ ve $CaCl_2$ üç farklı konsantrasyonda (2, 5 ve 10 mM) eklenerek üç günlük inkübasyon sonrası toplanan ham ekstrakt örneklerinde proteolitik aktivite ölçüldü.

Şekil 3.4'te görüldüğü üzere büyüme ortamına metal iyonun eklenmesi test edilen tüm konsantrasyonlarda kontrole (metal içermeyen ortama) göre proteaz aktivitesinde artışa sebep oldu.

En yüksek proteolitik aktivite 5 mM $NaCl$ ve KCl varlığında not edilirken en düşük aktivite metal iyonun eklenmediği büyüme ortamından toplanan ham ekstraktta gözlemlendi.



Şekil 3.4. Metal iyon kaynağı ve konsantrasyonun proteaz aktivitesi üzerinde etkisi. Kontrol: Metal iyonu içermeyen büyüme ortamını ifade etmektedir

Dang ve diğ. (1997) monovalent katyonların serin proteaz aktivitesini indükleyici etkisini araştırdıkları çalışmanın sonuçları, bu çalışmada elde edilen bulguları desteklemektedir.

Özetle, *S. thermophilum*'dan hücre dışı proteaz enziminin optimum üretimi için fermantasyon koşulları (%1 (a/h) glukoz, %1 (a/h) maya ekstraktı ve 5 mM KCl içeren büyüme ortamında üç gün inkübasyon) belirlenmiş olup proteaz enzimini elde etmek üzere gerçekleştirilen saflaştırma çalışmalarında belirlenen fermantasyon koşullarında toplanan ham ekstrakt örnekleri kullanıldı.

3.2. *S. thermophilum*'dan Proteaz Enzimin Saflaştırılması

Optimum koşullarda üretilen proteaz enzimini içeren ham ekstraktan (süpernatant) proteaz enziminin saflaştırılmasında hem sulu ikili faz sistemi hem de kromatografi kullanıldı. İki farklı yöntemle saflaştırılan enzimin saflaştırma parametreleri karşılaştırıldı.

3.2.1 Sulu ikili faz sistemi ile saflaştırma

S. thermophilum'dan proteaz enziminin saflaştırılmasında sulu ikili faz (0,2 mg/mL, 61,14 U/mg) sistemlerinden PEG / Tuz sistemi kullanıldı. Sistem parametreleri önceki raporlara göre seçildi (Işık, 2018). Saflaştırma verimini arttırmak üzere PEG molekül ağırlığı ve konsantrasyonu, sodyum sitrat (tuz) konsantrasyonu, sistem pH'sı, kosolüt olarak NaCl varlığı ve konsantrasyonu optimize edildi.

Sulu ikili faz sistemlerde PEG'in moleküler ağırlığı, sistemin etkinliğini belirleyen önemli bir faktördür. Polimer ve protein arasındaki kovalent olmayan etkileşimler biyomoleküllerin dağılımını değiştirir (Albertson, 1987; Hatti-Kaul, 2000; Raja ve diğ., 2012). Yüksek moleküler ağırlığına sahip PEG kullanıldığında proteinin hacimsel alanı kısıtlanır ve proteinlerin tuzca zengin faza doğru hareketine sebep olur. Düşük moleküler ağırlıklı PEG çözeltisi kullanıldığında ise protein için serbest hacim sağlanır, bu da proteinin üst fazda düşük ara yüzey gerilimi nedeniyle proteinin seçici olarak üst fazda kalmasını sağlar (Goja ve diğ., 2013). PEG molekül ağırlığının proteaz dağılımı üzerindeki etkisini araştırmak üzere PEG3000, PEG4000, PEG6000 ve PEG8000 ile hazırlanmış farklı ATPS'ler kullanıldı. Tüm sistemlerde faz oluşturmada tuz olarak sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7$) kullanılarak deneyler pH 6,0, 7,0 ve 8,0 olmak üzere üç farklı pH'da gerçekleştirildi. Sistemin pH'sı, enzimin fazlar arasında seçici ayırımında önemli olan bir diğer faktördür, çünkü pH'nin değişimi sistemi oluşturan protein veya diğer yüklü moleküllerin net yükünü değiştirebilir dolayısıyla da fazlardaki ayırımı etkileyebilir (Albertson, 1987; Hatti-Kaul, 2000; Raja ve diğ., 2012). Bu sebeple ATPS'ler üç farklı pH'da hazırlandı.

Sonuçlar, Tablo 3.1.'te verilmektedir. Test edilen sistemlerin büyük çoğunluğunda (pH 7,0'de hazırlanan PEG1000 ve pH 8,0'de hazırlanan PEG8000 hariç) iki faz oluşumu gözlenirken proteaz enziminin ağırlıklı olarak alt fazda toplandığı belirlendi. *S. thermophilum* proteazı için en iyi saflaştırma katsayısı (1,3-kat) PEG6000 ile pH 8,0'da hazırlanan sistemde elde edildi. Bu nedenle, sonraki deneylerde PEG6000 kullanarak pH 8,0'da hazırlanan sistem tercih edildi.

Benzer şekilde, Amid ve diğ. (2012) tarafından mango meyvesi ile yapılan çalışmada en yüksek saflaştırma katsayısına pH 8,0'da ulaşıldığı bildirilmiştir. Alkalin özellik gösteren proteaz enzimleri için pH 8,0'da seçici dağılım gözlenmesi beklenen bir bulgudur.

Tablo 3.1. Sistem pH'sı ve PEG molekül ağırlığının proteaz dağılımına etkisi

pH	PEG MA	Alt faz SA (U/mg)	Üst faz SA (U/mg)	SK	GK (%)
6,0	1000	28,3	21,4	1,2	66
	3000	13,4	10,9	0,7	69
	4000	19,2	4,6	1,0	69
	6000	15,5	3,6	0,8	68
	8000	18,2	3,0	0,9	68
7,0	1000	(-)	(-)	(-)	(-)
	3000	19,5	1,3	1,0	57
	4000	22,8	1,9	1,2	58
	6000	19,5	1,7	1,0	59
	8000	21,1	1,0	1,1	58
8,0	1000	52,9	10,5	1,2	63
	3000	46,1	0,7	1,1	64
	4000	50,1	0,8	1,2	66
	6000	56,1	2,1	1,3	67
	8000	(-)	(-)	(-)	(-)

*MA: Moleküler ağırlık; SA: Spesifik aktivite; SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Aktivite geri kazanımı. PEG ve tuz konsantrasyonları sabit tutulmuş olup her birinin derişimi %15 (a/a) olacak şekilde hazırlandı. 200 µL ham ekstraktın spesifik proteaz aktivitesi 61,14 (U/mg), toplam protein miktarı ise 0,71 mg hesaplandı. (-), faz oluşmadığını ifade eder.

Genel olarak saflaştırma katsayısı ve aktivite geri kazanım değerlerine bakıldığında PEG molekül ağırlığının proteaz dağılımını önemli ölçüde etkilemediği görüldü. Aktivite geri kazanım değerleri ise pH 6,0 ve 8,0'de nötral pH'ya göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

PEG tipi belirlendikten sonra PEG konsantrasyonunun proteaz enziminin sulu ikili faz (PEG/Sodyum Sitrat) sistemi içerisindeki dağılımına etkisini incelemek amacıyla %10 – %20 (a/a) arasında değişen konsantrasyonlarda (%10, 12,5, 15, 17,5 ve 20, a/a) PEG6000 çözeltileri hazırlanarak %15 (a/a) sodyum sitrat ve 200 µL ham ekstrakt varlığında pH 8,0'da beş farklı ATPS tasarlandı.

Tüm sistemlerde faz ayrımı gözlenmiş olup saflaştırma parametrelerine ait değerler Tablo 3.2'de verilmektedir. Buna göre en yüksek saflaştırma katsayısı (1,6-kat), %12,5 (a/a) PEG6000 varlığında tespit edildi. Sonraki optimizasyon deneylerinde kullanmak üzere ATPS sistemlerinde PEG6000 %12,5 (a/a) olacak şekilde hazırlandı.

Tablo 3.2. PEG6000 konsantrasyonunun proteaz dağılımına etkisi

PEG6000 konsantrasyonu (%, a/a)	Alt faz SA (U/mg)	Üst faz SA (U/mg)	SK	GK (%)
10	60,2	17,3	1,4	70
12,5	68,7	16,0	1,6	69
15	56,1	2,1	1,3	67
17,5	36,4	8,4	0,8	56
20	43,1	14,7	1,0	57

* SA: Spesifik aktivite; SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Aktivite geri kazanımı. PEG çeşidi (PEG6000), sistem pH'sı (8,0) ve tuz konsantrasyonu (%15, a/a) sabit tutuldu. 200 µL ham ekstraktın spesifik proteaz aktivitesi 61,14 (U/mg), toplam protein miktarı ise 0,71 mg hesaplandı.

Sulu ikili faz sistemleri üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde polimer konsantrasyonunun artmasının hem fazlar hem de PEG molekülü ve protein arasındaki hidrofobik etkileşimleri arttırdığı ve buna bağlı olarak enzimin üst faza doğru hareketine sebep olduğu belirtilmiştir (Cascone ve diğ., 1991; Mohamadi ve diğ., 2007; Su ve Chiang, 2006). Tablo 3.2'de de görüldüğü üzere saflaştırma katsayısı ve enzim geri kazanım değerleri PEG konsantrasyonunun artışına bağlı olarak düşüş gösterdi. PEG6000'nin %12,5 (a/a)'un üzerinde sistemde biyomolekülleri üst fazda hacimce sıkıştırarak alt faza doğru hareket ettirdiği ve bu sebeple alt fazda bulunan proteaz enziminin saflaştırma kat sayısını düşürdüğü önerilmektedir (Albertson, 1987; Hatti-Kaul, 2000; Raja ve diğ., 2012).

Sistem pH'sı, PEG tipi ve konsantrasyonu belirlendikten sonra tuz konsantrasyonunu optimize etmek üzere %12,5 (a/a) PEG6000 varlığında pH 8,0'da hazırlanan ATPS sisteminde son konsantrasyonu %10 ila %20 (a/a) olacak şekilde sodyum sitrat çözeltileri eklendi. Tuz konsantrasyonunun *S. thermophilum* proteaz enziminin ATPS'deki dağılımına etkisi Tablo 3.3'te verilmektedir.

Tablo 3.3'te görüldüğü gibi sodyum sitrat konsantrasyonu %10 (a/a) olduğunda faz ayrımı görülmedi, en yüksek saflaştırma katsayısı (1,8-kat) ve aktivite geri kazanım değeri (%69) ise tuz konsantrasyonu %12,5 (a/a) iken elde edildi. Tuz konsantrasyonu arttığında saflaştırma katsayısının düştüğü tespit edildi Literatüre bakıldığında bu durum "salting out" etkisiyle açıklanabilir.

Bu etkiye göre tuz derişiminin artması proteinlerin hidrofobitesini artırarak enzimlerin üst faza doğru hareket etmesine sebep olmaktadır.

Tablo 3.3. Sodyum sitrat konsantrasyonunun proteaz dağılımına etkisi

Sodyum sitrat konsantrasyonu (% a/a)	Alt faz SA (U/mg)	Üst faz SA (U/mg)	SK	GK (%)
10	(-)	(-)	(-)	(-)
12,5	82,7	29,3	1,8	69
15	68,7	16,0	1,6	69
17,5	68,4	46,0	1,0	59
20	69,3	58,3	1,0	59

* SA: Spesifik aktivite; SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Aktivite geri kazanımı. PEG6000 (% 12,5, a/a) derişimi, sistem pH'sı (8,0) ve tuz çeşidi sabit tutuldu. 200 µL ham ekstraktın spesifik proteaz aktivitesi 61,14 (U/mg), toplam protein miktarı ise 0,71 mg hesaplandı. (-), faz oluşmadığını ifade eder.

Ayrıca tuz konsantrasyonunun yüksek olması protein denatürasyonuna sebep olarak saflaştırma katsayısı ve aktivite geri kazanım gibi saflaştırma parametrelerini düşürmektedir (Güleç, 2015; Siqueira ve diğ., 2020).

S. thermophilum proteaz enziminin ATPS ile saflaştırılması için planlanan son optimizasyon basamağı kosolüt olarak seçilen NaCl'nin derişimin belirlenmesidir. Literatürde yeralan çalışmalar incelendiğinde ATPS ile protein saflaştırılması sırasında verimliliği artırmak üzere nötral tuzların (örnek, NaCl) eklenmesi önerildiği görülmüştür. NaCl'nin özellikle enzimin dağılıma katsayısı üzerinde oldukça etkili olduğu görülmektedir (Karkaş ve Önal, 2012; Yücekan ve Önal, 2011). Diğer taraftan düşük NaCl konsantrasyonlarının ATPS'yi etkilemediği ancak, yüksek tuz konsantrasyonları faz diyagramını değiştirebileceği öne sürülmüştür (Iqbal ve diğ., 2016).

NaCl etkisinin proteaz dağılımına etkisini araştırmak üzere %1 (a/a)'den %12 (a/a)'ye kadar değişen konsantrasyonlarda hazırlanarak sisteme eklendi ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.4'te verildi. Buna göre, sisteme kosolüt eklenmesi proteazın fazlar arasında dağılımını etkilemiş gözükmektedir. En yüksek saflaştırma katsayısı (5,1) ve aktivite geri kazanım (%78) değerleri sisteme %7 (a/a) oranında NaCl eklenmesiyle elde edildi. %7 (a/a)'nin üstüne çıkıldığında ise hem saflaştırma katsayısı hem de enzim geri kazanım değerlerinde düşüş gözlemlendi. Literatürde kosolüt varlığına bağlı olarak proteinin fazlar arasında seçici dağılımını gösteren benzer örnekler yer almaktadır (Amid ve diğ., 2012; Engel ve diğ., 2000; Mohamadi ve diğ., 2007).

Tablo 3.4. NaCl konsantrasyonunun proteaz dağılımına etkisi

NaCl konsantrasyonu (%, a/a)	Alt faz SA (U/mg)	Üst faz SA (U/mg)	SK	GK (%)
0	83	29	1,8	69
1	123	43	2,2	70
2	122	34	2,2	70
3	156	59	2,8	71
5	206	107	3,7	72
7	289	112	5,1	78
10	239	69	4,3	72
12	277	60	3,8	66

*SA: Spesifik aktivite; SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Aktivite geri kazanımı. PEG6000 (%12,5, a/a) derişimi, sodyum sitrat konsantrasyonu (%12,5, a/a) ve sistem pH'sı (8,0) sabit tutuldu. 200 µL ham ekstraktın spesifik proteaz aktivitesi 61,14 (U/mg) toplam protein miktarı ise 0,71 mg hesaplandı.

Sonuç olarak, optimum şartlar altında toplam ağırlık 10 gr olacak şekilde pH 8,0'da hazırlanan %12,5 (a/a) PEG6000, %12,5 (a/a) C₆H₅Na₃O₇ ve %7 (a/a) NaCl'den oluşan sulu ikili faz sisteminden katalaz enzimi yaklaşık olarak 5,1-kat ve %78 aktivite geri kazanımla saflaştırıldı. Bu çalışmada elde edilen saflaştırma katsayısı literatürde rapor edilen farklı bakteri ve küf örneklerinden sulu ikili faz sistemi ile saflaştırılan proteaz enzimleriyle büyük ölçüde benzerdir (Tablo 3.5).

Tablo 3.5 ATPS yöntemiyle saflaştırılan proteaz enzim örnekleri

Mikroorganizma	SK	GK (%)	Referans
<i>Bacillus cereus</i> VITSN04	4,1	88	Shakilanishi ve diğ., 2017
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA1576	1,5	108	Medeiros e Silva ve diğ., 2012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AG LSL 11	6,2	72	Koti ve diğ., 2012
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> URM4622	5,2	62	Lima ve diğ., 2013
<i>Scytalidium thermophilum</i>	5,1	78	Bu çalışma

*SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Aktivite geri kazanımı.

Ancak, aktivite geri kazanım değeri *Streptomyces* sp. ve *A. heteromorphus*'dan saflaştırılan proteaz enzimlerine göre daha düşüktür.

3.2.2. Kromatografik yöntem ile saflaştırma

S. thermophilum'dan hücre dışı proteaz enzimini saflaştırmada ATPS yanında yöntem verimliliğini karşılaştırmak üzere iyon değişim kromatografisi uygulandı.

Kromatografik yöntemlerle saflaştırılmak istenen proteaz enziminin ham ekstrat olarak kullanılacak supernatanı alındı. Anyon değiştirici kolona (HiPrep Q XL (16/10)) yüklenen supernatanın oluşturduğu fraksiyonlar proteaz aktiviteleri bakımından incelendi. Saflaştırma işlemlerine ait tüm bulgular Tablo 3.6’da verildi. Buna göre, proteaz enzimi tek basamakla ham ekstraktan %22 geri kazanımla 3 kat saflaştırıldı.

Tablo 3.6. Proteaz enziminin saflaştırma basamakları

	Hacim (mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (U)	SA (U/mg)	SK	GK (%)
Ham ekstrakt	200	24,13	2667	111	1	100
İyon değiştirme kolon çıktışı	15	1,73	575	332	3	22

*SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Aktivite geri kazanımı.

Literatürle farklı kaynaklardan kromatografik yöntemlerle saflaştırılmış proteaz enzimleri ile bu çalışmada saflaştırılan enzim bulguları Tablo 3.7’de karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen saflaştırma bulguları, *Beuveria bassiana*’dan izole edilen proteaz için verilen değerlerden daha yüksektir. Ancak, diğer örneklerde proteaz enziminin daha yüksek saflıkta elde edildiği görölmektedir.

Bunun başlıca sebebi saflaştırmada birden fazla basamağın yer alması sayılabilir. Diğer taraftan, bu çalışmada ölçölen aktivitedeki geri kazanım değeri *Bacillus cereus* S46’dan saflaştırılan proteaz enzimi için rapor edilen değere oldukça benzerdir.

Tablo 3.7. Kromatografik yöntemle saflaştırılan bazı proteaz enzimlerine ait bulguların karşılaştırılması

Mikroorganizma	Kromatografik yöntem	SK	GK (%)	Referans
<i>Aspergillus terreus</i>	Jel filtrasyon AEC	5	54	Abu-Tahon ve diğ., 2020
<i>Bacillus cereus</i> S46	Presipitasyon Diyaliz AEC	12	22	D’Souza ve diğ., 2020

Tablo 3.7. (Devamı). Kromatografik yöntemle saflaştırılan bazı proteaz enzimlerine ait bulguların karşılaştırılması

Mikroorganizma	Kromatografik yöntem	SK	GK (%)	Referans
<i>Neurospora crassa</i>	Amonyum sülfat çöktürmesi AEC Jel filtrasyon	9	61	Zheng ve diğ., 2020
<i>Bacillus cereus</i> S48	Amonyum sülfat çöktürmesi AEC Jel filtrasyon	8	48	Lakshmi ve diğ., 2018
<i>Bacillus alveayuensis</i> CAS 5	Jel filtrasyon	6	16	Annamalai ve diğ., 2014
<i>Beuveria bassiana</i>	Diyaliz Etanol presipitasyonu AEC	2	16	AlGhanimi ve diğ., 2020
<i>Lactobacillus fermentum R6</i>	Amonyum sülfat çöktürmesi AEC Jel filtrasyon	23	17,5	Sun ve diğ., 2020
<i>Scytalidium thermophilum</i>	AEC	3	22	Bu çalışma

AEC: İyon/Anyon değişim kromatografisi

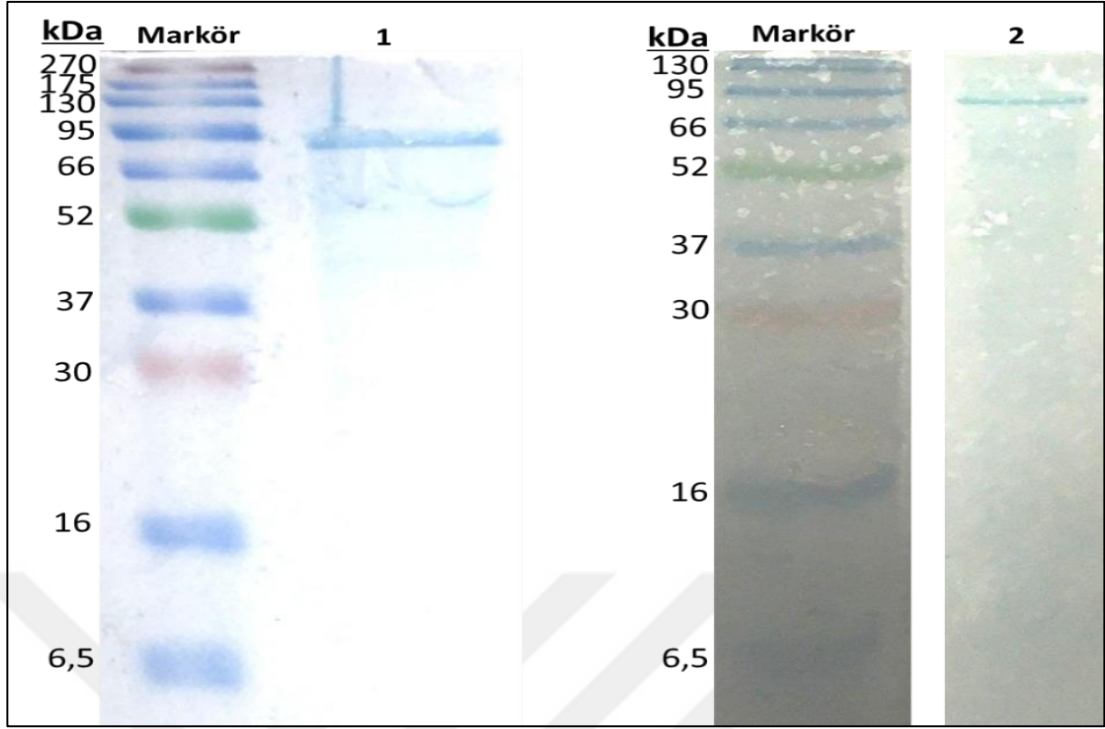
Genel olarak bakıldığında kromatografik yöntem kullanılarak yapılan saflaştırma denemelerinde saflık yüzdesi yüksek olmasına rağmen aktivitede gözlenen kayıp oldukça fazladır. Bu da ürünün uygulama alanını kısıtlamaktadır.

3.3. SDS-PAGE Analizi

S. thermophilum büyüme ortamından hem sulu ikili faz sistemi hem de kromatografi kullanarak saflaştırılan örneklerin saflığının kontrolü ve molekül ağırlığının tespiti amacıyla SDS-PAGE analizi ile gerçekleştirildi. Yapılan elektroforez sonrasında bantların hareketlilik değerleri ölçüldü.

Bantların moleküler ağırlığı ve hareketlilik değerleri Eşitlik 3.1 aracılığıyla hesaplandı ve bir standart eğri grafiği oluşturuldu (Şekil D.1.) sonrasında ise örneğin moleküler ağırlığı hesaplandı grafik sayesinde hesaplandı ve sonuç diğer mikrobiyal proteazların moleküler ağırlığıyla karşılaştırıldı. Elde edilen bant görüntüleri Şekil 3.5'de gösterilmiştir.

$$R_f = \frac{\text{Proteinin aldığı yol (cm)}}{\text{İzleme boyasının aldığı yol (cm)}} \quad (3.1)$$



Şekil 3.5. *S. thermophilum*'dan saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE jel görüntüsü. Markör: Prestained Protein Sharpmass VII Protein MW, 6,5 – 270; 1: iyon değiştirme kromatografisi ile sistemden izole edilen proteaz örneği; 2: ATPS ile saflaştırılmış proteaz örneği. Her kuyucuğa 20 µg örnek yüklendi.

Şekil 3.5'te gösterildiği üzere ATPS ve kromatografiden elde edilen örneklerde ≈ 80 kDa civarında tek bir bant gözlenmiş olup enzimin başarılı bir şekilde saflaştırıldığı kanıtlandı Tablo 3.8'de farklı kaynaklardan saflaştırılmış proteaz enzimlerinin molekül ağırlıkları karşılaştırılmıştır. Buna göre, proteaz enziminin moleküler ağırlığının mikroorganizmaya göre farklılık gösterdiği bilinmektedir.

Tablo 3.8 incelendiğinde proteaz molekül ağırlığının tür içerisinde bile farklılık gösterdiği görülmektedir. Literatür araştırmalarında proteaz enziminin molekül ağırlığının proteazın türünü belirlemede de bir kaynak olabileceğine dikkat çekilmiştir. Bu çalışmada enzim için bulunan molekül ağırlık değeri literatürde rapor edilen 24 ile 115 kDa aralığında olduğundan uyumludur.

Tablo 3.8. Farklı mikroorganizmalardan izole edilen proteaz enzimlerinin molekül ağırlıklarının karşılaştırılması

Mikroorganizma	Molekül Ağırlığı (kDa)	Referans
<i>Bacillus marmariensis</i>	24	Öner, 2009
<i>Aspergillus foetidus</i>	51	Souza ve diğ., 2017

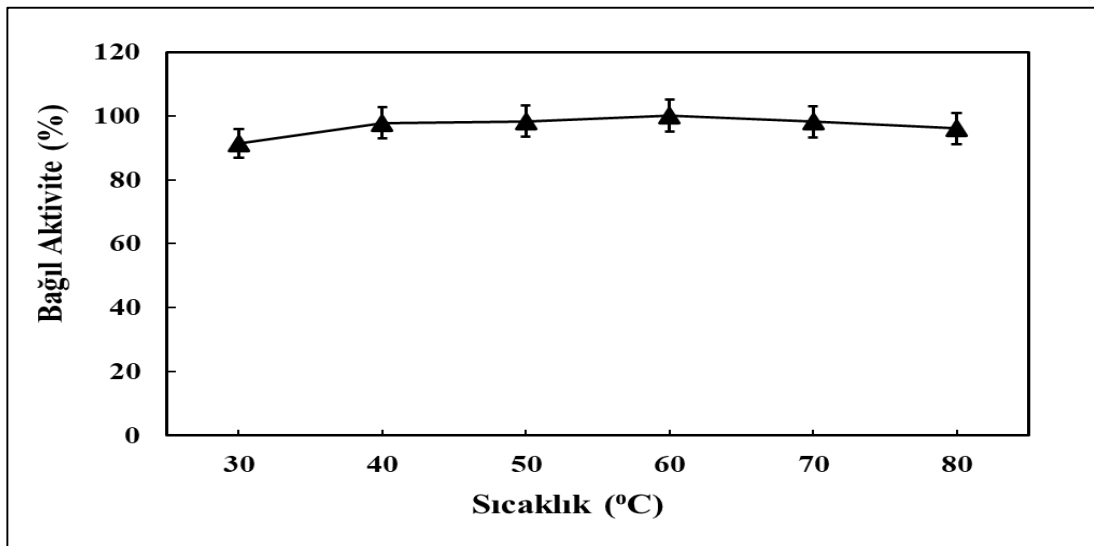
Tablo 3.8 (Devamı) . Farklı mikroorganizmalardan izole edilen proteaz enzimlerinin molekül ağırlıklarının karşılaştırılması

Mikroorganizma	Molekül Ağırlığı (kDa)	Referans
<i>Mucor subtilissimus</i>	97	Nascimento ve diğ., 2016
<i>Lactobacillus sakei</i>	88	Sanz ve Toldrá, 2001
<i>Bacillus sp. KG5</i>	48	Ahmetoglu ve diğ., 2015
<i>Bacillus sp. M33</i>	39	Sonuc Karaboga ve Logoglu, 2019
<i>Bacillus sp.</i>	62	Kamran ve diğ., 2014
<i>Halogeometricum borinquense</i>	86	Vidyasagar ve diğ., 2006
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	68	Chimbekujwo ve diğ., 2020
<i>Leishmania donovani</i>	115	Choudhury ve diğ., 2013
<i>Stenotrophomonas maltophilia SK</i>	98	Waghmare ve diğ., 2015
<i>S. thermophilum</i>	80	Bu çalışma

3.4. Saflaştırılmış *S. thermophilum* Proteazının Karakterizasyonu

3.4.1. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Reaksiyon sıcaklığının proteaz enzimi üzerine etkisini araştırmak üzere 30 °C– 80 °C arası sıcaklıklarda yapılan deneyler sonucundan reaksiyon sıcaklığı 60 °C’de en yüksek aktivite değerine ulaşıldı (Şekil 3.6.). 60 °C’nin üzerine çıkıldığında enzimin bağıl aktivitesinde düşüş gözlemlendi ancak 70 °C ve 80 °C’de dahi proteaz enzim aktivitesinin ≥ 96 ’nın korunduğu gözlemlendi.



Şekil 3.6. *S. thermophilum* proteazının farklı sıcaklıklardaki bağıl aktivite grafiği

Farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilen proteazlar incelendiğinde optimum sıcaklık aralığının 40 ila 70 °C arasında olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.9). Ayrıca *Cellulomonas bogoriensis* proteazının optimum sıcaklık değeri (Li ve diğ., 2016) bu çalışmada kullanılan proteaz enzimine benzerlik göstermektedir.

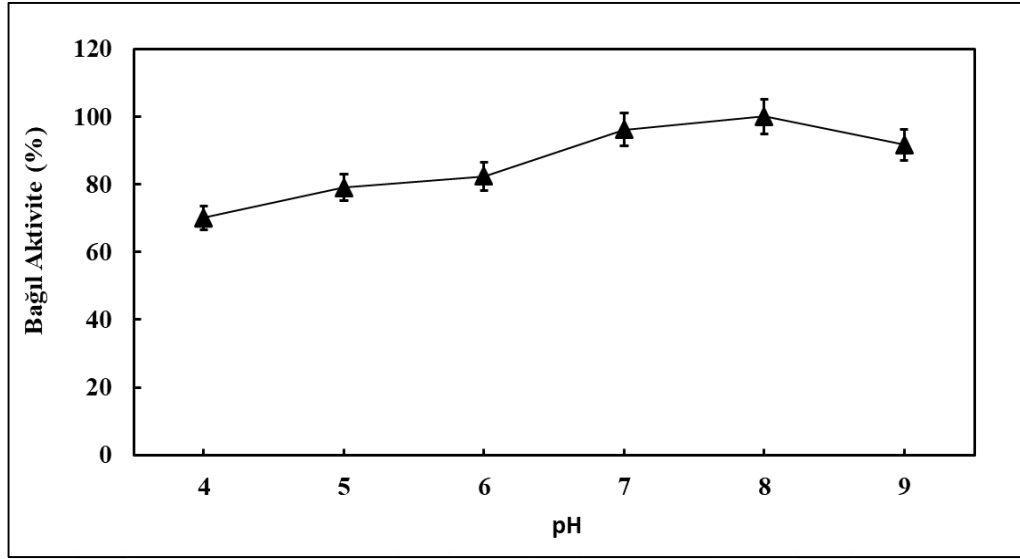
Tablo 3.9. Farklı mikroorganizmalardan izole edilen proteaz enzimlerinin sıcaklık ve pH profillerinin karşılaştırılması

Mikroorganizma	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH	Termal kararlılık aralığı (°C)	pH kararlılık aralığı	Referans
<i>Chaetomium thermophilum</i> (PRO33)	65	10,0	50-65	10,0	Li ve diğ., 2007
<i>Aspergillus tamarii</i> URM4634	40	8,0	40	8,0-9,0	Silva ve diğ., 2017
<i>Aspergillus flavus</i>	50	7,0	30-50	3,0-8,0	Muthulakshmi ve diğ., 2011
<i>Cellulomonas bogoriensis</i>	60	11,0	4-60	3,0-12,0	Li ve diğ., 2016
<i>Bacillus subtilis</i> K-1	50	10,0	30-70	7,0-10,0	Singh ve diğ., 2017
<i>Bacillus</i> sp.	70	8,0	70	9,0-10,0	Padmapriya ve diğ., 2012
<i>Neurospora crassa</i> CGMCC308	55	9,0	30-45	6,0-10,0	Zheng ve diğ., 2020
<i>Bacillus caseinolyticus</i>	60	8,0	30-60	6,0-10,0	Mothe ve Sultanpuram, 2016
<i>Halococcus</i> sp. GUGFAWS-3	70	7,0	70	3,0-13,0	Gaonkar ve Furtado, 2020
<i>Scytalidium thermophilum</i>	60	8,0	30-60	4,0-9,0	Bu çalışma

3.4.2. Reaksiyon pH'sının enzim aktivitesi üzerine etkisi

S. thermophilum proteaz aktivitesinin farklı pH aralılarındaki (pH 4,0 – 9,0) değerleri incelendi. Şekil 3.7'de görüldüğü üzere reaksiyon ortamının pH'sı 8,0 iken en yüksek bağıl aktivite değeri elde edildi. Diğer taraftan, pH 6,0'da yaklaşık %82 bağıl aktivite değeri ölçülürken pH 6,0'nın altında (pH 4,0 ve pH 5,0) %70-76 arasında korunduğu pH 9,0'da ise bağıl aktivitenin %90 civarı olduğu tespit edildi (Şekil 3.7).

Farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilen proteazlar incelendiğinde optimum pH aralığının 7,0 ila 11,0 arasında olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.9.).



Şekil 3.7 *S. thermophilum* proteaz aktivitesine pH'nın etkisi

Ayrıca literatür incelendiğinde *Aspergillus tamarisii* proteazının optimum pH değeri (Silva ve diğ.,2017), bu çalışmada kullanılan proteaz enzimine benzerlik göstermektedir.

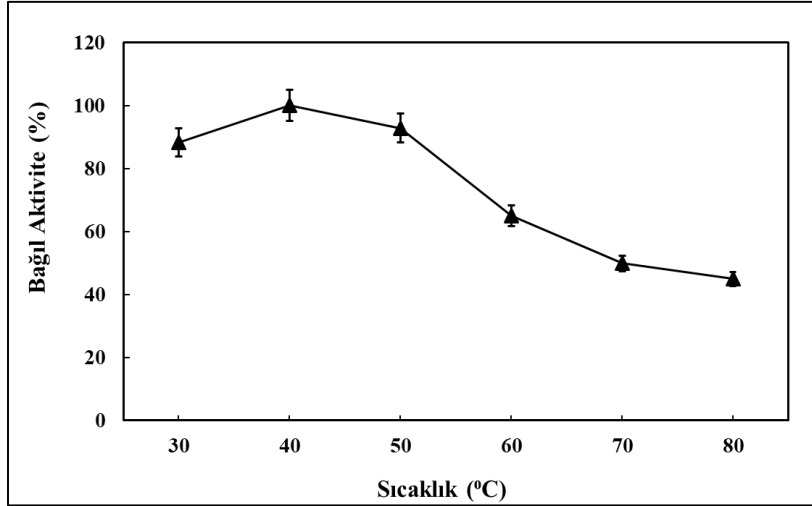
3.4.3. Proteaz termal kararlılığı

Enzim kararlılığına sıcaklığın etkisini araştırmak amacıyla saflaştırılan örnekler 60 dak boyunca 30 °C - 80 °C aralığında inkübe edildi. Bir saatlik inkübasyonun sonunca enzimin aktivitesi hesaplandı.

Şekil 3.8'e göre enzimin başlangıç aktivitesini koruduğu en yüksek sıcaklığın 40 °C olduğu tespit edildi. 40°C'lik sıcaklık değerinin üzerine çıkıldığında ise enzim aktivitesinde düşüş olduğu gözlemlendi. Proteaz enziminin enzim aktivitesinin 50 °C ve 60 °C'de sırasıyla %93 ve %65'inin korunduğu tespit edildi.

Sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında enzimin 30-60 °C aralığında kararlı ve kısmen geniş bir termal kararlılığa sahiptir olduğu sonucuna varıldı (Tablo 3.9).

Isıya dayanıklı proteazların biyoteknolojik ve endüstriyel çalışmalar açısından denatüre edici ajanlara ve kimyasallara karşı dayanıklılığı oldukça değerli görülmektedir ve elde edilen sonuçlar çalışmada kullanılan proteaz enziminin endüstriyel açıdan kullanılabileceğini göstermiştir (Sarkar ve Suthindra, 2020).

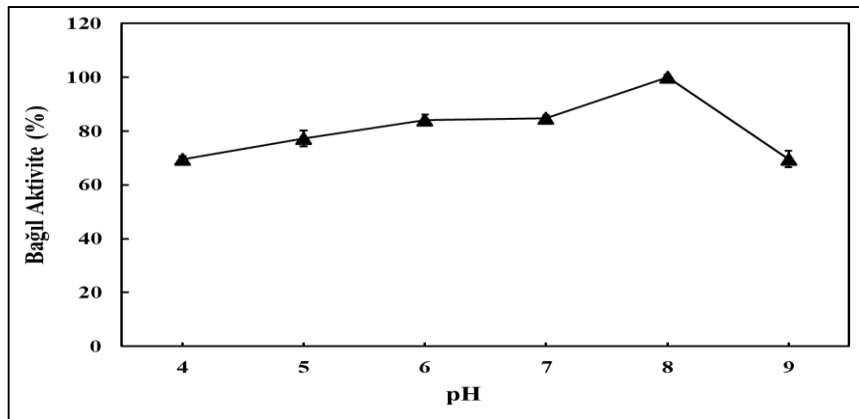


Şekil 3.8. *S. thermophilum* proteazının termal kararlılığı

3.4.4. *S. thermophilum* proteazının pH kararlılığı

Çeşitli pH değer aralıklarında yapılan (4,0 – 9,0) pH kararlılık deneylerinin sonuçları Şekil 3.9’da verilmektedir. Buna göre, proteaz enziminin başlangıç aktivitesini tamamen koruduğu pH değeri 8,0 olarak belirlendi. Diğer taraftan pH 4,0 ila 9,0 arasında optimum aktivite değerinin ≥ 70 ’inin korunduğu gözlemlendi. Sonuç olarak proteaz enziminin pH stabilite aralığı pH 4,0 – 9,0 olarak belirlendi (Şekil 3.9).

Tablo 3.9’deki farklı mikrobiyal kaynaklı proteaz enzimlerinin pH stabilite aralıkları karşılaştırıldığında, *S. thermophilum* proteazının geniş bir pH aralığında kararlı kalabildiği ortaya çıkarılmıştır. Bu özelliği, enzimin farklı endüstriyel uygulamalarda iyi bir katalizör olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır.



Şekil 3.9. *S. thermophilum* proteazının pH kararlılığı

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, termofilik bir küf olan *S. thermophilum*'dan optimum proteaz üretimini gerçekleştirmek üzere inkübasyon zamanı, glukoz konsantrasyonu, uygun azot kaynağının tespiti ve metal iyonun varlığı gibi fermantasyon koşullarının enzim aktivitesi üzerine etkileri test edildi. Optimum proteaz üretimi %4 (a/h) glukoz, %1 (a/h) maya ekstraktı, %0,05 (a/h) KCl ve %0,05 (a/h) K₂HPO₄ içeren YpSs sıvı besiyerinde üç gün süreyle inkübe edilen *S. thermophilum*'un kültür sıvısında gerçekleştirildi.

Santrifüj ile hücrelerden arındırılmış kültür sıvısı, "ham enzim ekstraktı" olarak proteaz enziminin saflaştırılmasında kullanıldı. Saflaştırma işlemi hem optimize edilmiş sulu ikili faz sistemi hem de kromatografi ile gerçekleştirildi ve saflaştırma parametreleri (saflaştırma katsayısı, enzim geri kazanımı ve spesifik aktivite değerleri) karşılaştırıldı. Buna göre, %12,5 (a/a) PEG 6000, %12,5 (a/a) C₆H₅Na₃O₇ ve %7 (a/a) NaCl'den oluşan sulu ikili faz sistemiyle *S. thermophilum*'dan proteaz enzimi 5,1-kat %78 geri kazanımla saflaştırıldı. Diğer taraftan, 1,73 mg/ml protein içeren örnek HiPrep Q XL (16/10) kolonundan %22 aktivite geri kazanımla 3-kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin SDS-PAGE yöntemi ile moleküler ağırlığı belirlendi ve yaklaşık 96 kDa olarak bulundu. Saf enzimle yapılan sıcaklık deneyleri enzimin optimum sıcaklığının 60 °C olduğunu, 40 °C'de aktivitesinin %100, 30 °C'de ise yaklaşık %88'ini koruduğunu gösterdi. 60 °C'nin üzerinde ise aktivitenin yarısının kaybolduğu belirlendi. Ortam pH'sının proteaz aktivitesine olan etkisi analiz edildiğinde enzimin optimum pH değeri 8,0 olarak ölçülürken pH 4,0'de proteolitik aktivitenin yaklaşık %70'inin pH 9,0'da ise %92'sinin korunduğu tespit edildi. Sıcaklık ve pH denemeleri, *S. thermophilum* proteazının geniş aralıkta kararlı olabileceğine işaret ederken enzimin biyokimyasal karakterizasyonu (farklı substratlar için kinetik parametrelerin hesaplanması, organik çözümler, inhibitörler ve metal iyonlarının aktivite üzerine etkilerinin spektrofotometrik yöntemle analizi) üzerine daha çok denemenin yapılmasının enzimin endüstride kullanım potansiyelinin aydınlatılmasında yararlı

bilgiler sunacağına inanılmaktadır. Bununla beraber sonuçların güvenilirliğinin arttırılması amacıyla faktöriyel dizayn yönteminden de yararlanılabilir.



KAYNAKLAR

Abu-Tahon MA., Arafat HH., Isaac GS., Laundry Detergent Compatibility And Dehairing Efficiency of Alkaline Thermostable Protease Produced from *Aspergillus terreus* Under Solid-State Fermentation, *J Oleo Sci.* 2020, **69**(3), 241-254.

Ahirwar S., Soni H., Prajapati BP., Kango N., Isolation and Screening of Thermophilic and Thermotolerant Fungi for Production of Hemicellulases from Heated Environments, *Mycology*, 2017, **8**(3), 125-134.

Ahmetoglu N., Bekler FM., Acer O., Guven RG., Guven K., Production, Purification and Characterisation of Thermostable Metallo-Protease from Newly Isolated *Bacillus sp* KG5, *EurAsian J Biosci.*, 2015, **9**, 1-11.

Albertson PA., Partition of Cell Particles and Macromolecules. Separation and Purification of Biomolecules, Cell Organelles, Membranes, and Cells in Aqueous Polymer Two-Phase Systems and Their Use in Biochemical Analysis and *Biotechnology*, **3**, Wiley-Interscience, New York, 1987.

AlGhanimi AAJ., AlEbadi SMA., Al-Ethari AYH., Partial Purification and Characterization of Protease from Local Isolate of *Beuveria bassiana*, *Sci J Med Res.* 2020, **4**, 17-22.

Alhelli AM., Manap MYA., Mohammed AS., Mirhosseini H., Suliman E., Shad Z., Mohammed NK., Hussin ASM., Response Surface Methodology Modelling of An Aqueous Two-Phase System For Purification of Protease from *Penicillium candidum* (PCA 1/TT031) Under Solid State Fermentation and Its Biochemical Characterization, *Int J Mol Sci.*, 2016, **17**, 1-23.

Amid M., Shuhaimi M., Islam Sarker MZ., Abdul Manap MY., Purification of Serine Protease from Mango (*Mangifera indica* Cv. Chokanan) Peel Using an Alcohol/Salt Aqueous Two Phase System, *Food Chem.*, 2012, **132**, 1382-1386.

Annamalai N., Rajeswari MV., Balasubramanian T., Extraction, Purification and Application of Thermostable Andhalostable Alkaline Protease from *Bacillus alveyuensis* CAS 5 Using Marine Wastes. *Food Bioprod Process.*, 2014, **92**, 335-342.

Araújo R., Casal M., Cavaco-Paulo A., Application of Enzymes for Textile Fibres Processing, *Biocatal Biotransformation*, 2008, **26**, 332-349.

Arya P., Jani SA., Rajput KN., Raval V., Thermostable Alkaline Proteases from Bacteria: A Review, *SSRN Electron J.*, 2020, 1-16.

Asenjo JA., Andrews BA., Aqueous Two-Phase Systems for Protein Separation: Phase Separation and Applications., *J Chromatogr A.*, 2012, **123**, 1-10.

Asha B., Palaniswamy M., Optimization of Alkaline Protease Production by *Bacillus cereus* FT 1 Isolated from Soil, *J Appl Pharm Sci.*, 2018, **8**, 119-127.

Atav R., Ekinci Karaboga S., Improvement of Dyeability of Silk Fiber by Enzymatic Modification with Proteases., *Afyon Kocatepe Univ J Sci Eng.*, 2017, **17**, 138-148.

Barrett JA., Proteases, *Current Protocols in Protein Science*, 2000, **21**, 12.1.1-12.1.12.

Bdewe SAB., Partial Purification and Characterization of Protease Enzymes from *Bacillus cereus*, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kayseri, 2020.

Bergmann M., Fraenkel-Conrat H., The Role of Specificity in the Enzymatic Synthesis of Proteins: Syntheses with Intracellular Enzymes, *J. Biol. Chem.* 1937, **119**, 707-720.

Blum H., Beier H., Gross HJ.. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels, *Electrophoresis*, 1987, **8**(2), 93-99.

Cascone O., Andrews BA., Asenjo JA., Partitioning and Purification of Thaumatin in Aqueous Two-Phase Systems, *Enzyme Microb. Technol*, 1991, **13**, 629-635.

Chalabi M., Khademi F., Yarani R., Mostafaie A., Proteolytic Activities of Kiwifruit Actinidin (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) on Different Fibrous and Globular Proteins: A Comparative Study of Actinidin with Papain, *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, **172**, 4025-4037.

Chanalia P., Gandhi D., Jodha D., Singh J., Applications of Microbial Proteases in Pharmaceutical Industry: An Overview, *Rev Med Microbiol.*, 2011, **22**, 96-101.

Chavan RS., Avhad DN., Rathod VK., Optimization of Aqueous Two-Phase Extraction of Protease Produced from *Bacillus licheniformis* NCIM 2042 Using Response Surface Methodology., *Sep Sci Technol.*, 2015, **50**, 45-55.

Chimbekujwo KI., Ja'afaru MI., Adeyemo OM., Purification, Characterization and Optimization Conditions of Protease Produced by *Aspergillus brasiliensis* Strain BCW2, *Sci African.*, 2020, **8**, e00398.

Choudhury R., Das P., De T., Chakrabortia T.. 115 kDa Serine Protease Confers Sustained Protection to Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania Donovanii* via IFN- γ Induced Down-Regulation of TNF-A Mediated MMP-9 Activity, *Immunobiology*, 2013, **218**(1), 114-126.

Clark D., Pazdernik NC., Proteomics, *Biotechnology*, 2016, 295-333.

Cooney DG., Emerson GR., Thermophilic Fungi. An Account of Their Biology, Activities and Classification, Freeman W.H., San Francisco and London 1966.

D'Souza DH., Bhattacharya S., Das A., Fibrinolytic Protease from *Bacillus cereus* S46: Purification, Characterization, and Evaluation of Its In Vitro Thrombolytic Potential., *J Basic Microbiol.*, 2020, **60**, 661-668.

Dadı Ş., *Clostridium botulinum* Tip A'dan Proteaz Enziminin Kısmi Olarak Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2012, 330693.

Dağbağlı S., Beta-Galaktosidaz Enzim Üretiminin Optimizasyonu ve Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2009, 252596.

Dang Q., Guinto E., Cera E., Rational engineering of activity and specificity in a serine protease, *Nat. Biotechnol.*, 1997, **15**, 146-149.

De Souza PM., de Assis Bittencourt ML., Caprara CC., De Freitas M., De Almeida RPC., Silveria D., Fonseca MY., Filho EXF., Junior AP., Magalhaes PO., A Biotechnology Perspective of Fungal Proteases. *Brazilian J Microbiol.* 2015, 46, 337-346.

Del Rosso JQ., Application of Protease Technology in Dermatology: Rationale for Incorporation Into Skin Care with Initial Observations on Formulations Designed for Skin Cleansing, Maintenance of Hydration, and Restoration of the Epidermal Permeability Barrier, *J. Clin. Aesthet. Dermatol.*, 2018, **6**, 14-22.

Dhillon A., Sharma K., Rajulapati V., Goyal A., Proteolytic Enzymes, *Elsevier B.V.*, 2017, **7**, 149-173.

Di Cera E., Serine Proteases, *IUBMB Life.*, 2009, **61**, 510-515.

DiLallo R., Albertson OR., Volatile acids by Direct Titration., *J. Water Pollut. Control Fed.*, 1961, **23**, 353-365.

Engel S., Barak Z., Chipman DM., Merchuk JC., Purification of acetohydroxy Acid Synthase by Separation in An Aqueous Two-Phase System, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 2000, **743**, 281-286.

Feofilova EP., Tereshina VM., Thermophily of Mycelial Fungi as Related to Biochemical Adaptation to Temperature Stress, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 1999, **5**, 546-556.

Fernandes LMG., Carneiro-da-Cunha MN., Silva J de C., Porto ALF., Porto TS., Purification and Characterization of a Novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 Protease Extracted by Aqueous Two-Phase Systems PEG/Citrate, *J Mol Liq.*, 2020, **317**, 113957.

Gaonkar SK., Furtado II., Characterization of Extracellular Protease from the Haloarcheon *Halococcus sp.* Strain GUGFAWS-3 (MF425611), *Curr Microbiol.* 2020, **77**, 1024-1034.

Garay-Flores RV., Segura Cenciceros EP., Gamez de Leon R., Garcia CB., Hernandez JLB., Lozano GG., Aguilar CN., Ilyina A., Producy and Partial Characterization of Glucose Oxidase and Catalase from Xerophytic Strain of *Aspergillus niger*, *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2014, **29**, 2788-2800.

Goja MA., Yang H., Cui M, Li C., Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation, *J. Bioprocess. Biotechnol.*, 2013, **4**, 1-8.

Gupta R., Beg Q., Lorenz P., Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **59**, 15-32.

Gurumallesh P., Alagu K., Ramakrishnan B., Mathusamy S., A Systematic Reconsideration on Proteases, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, **128**, 254-267.

Güleç E., Sulu İkili Faz Sistemi ile *Agaricus bisporus* Atıklarından Lakkaz Geri Kazanımı, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2015, 411319.

Haq IU, Mukhtar H, Umber H. Fermentation Medium Optimization for the Biosynthesis of Protease by *Penicillium chrysogenum* In Shake Flasks. *Pak J. Zool.* 2008, **40**, 69-73.

Hasbay Ifrij I., Ögel ZB., Production of Neutral and Alkaline Extracellular Proteases by the Thermophilic Fungus, *Scytalidium thermophilum*, Grown on Microcrystalline Cellulose *Biotechnol Lett.*, 2002, **24**, 1107-1110.

Hatti-Kaul R., Aqueous Two-phase Systems: Methods and Protocols, *Molecular Biotechnology*, 2001, **19**, 269-277.

Hong Yang AMG., Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation, *J Bioprocess Biotech.*, 2013, **4**, 1-8.

Ibrahim ASS., Al-Salamah AA., Elbadawi YB., El-Tayeb MA., Shebl Ibrahim SS., Production of Extracellular Alkaline Protease by New Halotolerant Alkaliphilic *Bacillus sp.* NPST-AK15 Isolated from Hyper Saline Soda Lakes, *Electron J. Biotechnol.*, 2015, **18**(3), 236-243.

Idowu AT., Igiehon OO., Idowu S., Olatunde OO., Benjakul S., Bioactivity Potentials and General Applications of Fish Protein Hydrolysates, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2021, **27**, 109-118.

Iqbal M., Tao Y., Xie S., Zhu Y., Chen D., Wang X., Huang L., Peng D., Sattar A., Shabbir MAB., Hussain HI., Ahmed S., Yuan Z., Aqueous Two-Phase System (ATPS): an Overview and Advances in Its Applications, *Biol. Proced Online.*, 2016, **18**, 1-18.

Işık S., *Bacillus pumilus* Y7 Tarafından Üretilen Katalaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2018, 521933.

Joshi PA., Singh N., Shekhawat DB., Effect of Metal Ions on Growth and Biosurfactant Production by Halophilic Bacteria, *Adv. Appl. Sci. Res.*, 2015, **6**, 152-156.

Kamath P., Subrahmanyam VM., Rao JV., Raj PV., Optimization of Cultural Conditions for Protease Production by a Fungal Species, *Indian J Pharm Sci.*, 2010, **72** (2), 161-166.

Kamran A., Bibi Z., Kamal M., Purification and Molecular Weight Estimation of Protease from a Thermophilic *Bacillus* species, *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2014, **47**, 3-4.

Karkaş T., İvertaz Enziminin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması İçin Sulu İkili-Faz Afinite Sistemlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2009, 252648.

Karkaş T., Önal S., Characteristics of İvertase Partitioned in Poly(Ethylene Glycol)/Magnesium Sulfate Aqueous Two-Phase System, *Biochemical Engineering Journal*, 2012, **60**, 142-150.

Kerimak Öner MN., Zorunlu Alkalifilik *Bacillus marmariensis* Gmbe 72 Soyundan İzole Edilen Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2009, 259381.

Khambhaty Y., Applications of Enzymes in Leather Processing, *Environ. Chem. Lett.*, 2020;**18**, 747-769.

Koti BA., Lakshmikanth M., Manohar S., Lalitha J., Aqueous Two-Phase Extraction for The Purification of Alkaline Agarases from Culture Extracts of *Pseudomonas aeruginosa* AG LSL-11, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2012, **42**, 364-377.

Kudryavtseva OA., Dunaevsky YE., Kamzolkin OA., Belozersky MA., Fungal Proteolytic Enzymes: Features of the Extracellular Proteases of Xylotrophic Basidiomycetes, *Microbiology*, 2008, **77**, 643-653.

Laemmli UK., Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 1970, 680-685.

Lakshmi BKM., Muni Kumar D., Hemalatha KPJ., Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8, *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 2018, **16**, 295-304.

Lario LD., Malpiedi LP., Pereira JFB., Sette LD., Pessoa-Junior A., Liquid-liquid Extraction of Protease From Cold-Adapted Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7 Using Biocompatible and Biodegradable Aqueous Two-Phase Systems, *Sep. Sci. Technol.*, 2016, **51**, 57-67.

Li AN., Ding AY., Chen J., Liu SA., Zhang M., Li DC., Purification and Characterization of Two Thermostable Proteases From The Thermophilic Fungus *Chaetomium thermophilum*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **17**, 624-631.

Li F., Yang L., Lv X., Liu D., Xia H., Chen S., Purification and Characterization of a Novel Extracellular Alkaline Protease from *Cellulomonas bogoriensis*, *Protein Expression and Purification*, 2016, **121**, 125-132.

Lima CA., Júnior ACVF., Filho JLL., Lima Filho JL., Converti A., Marques DAV., Carneiro-da-Cunha MG., Porto ALF., Two-phase Partitioning and Partial Characterization of a Collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 Application to collagen hydrolysis, *Biochem. Eng. J.*, 2013, **75**, 64-71.

Madhusudhan MC., Raghavarao KSMS., Aqueous Two Phase Extraction of İvertase from Baker's Yeast: Effect of Process Parameters on Partitioning, *Process Biochemistry*, 2011, **46**, 2014-2020.

Mahajan RT., Badgujar SB., Biological Aspects of Proteolytic Enzymes : A Review, *J. Pharm. Res.*, 2010, **3**, 2048-2068.

Mashayekhi Mazar F., Shahbaz Mohammadi H., Ebrahimi-Rad M., Gregorian A., Omidinia E., Isolation, Purification and Characterization of a Thermophilic Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* BP-36., *J. Sci. Islam. Repub. Iran.*, 2012, **23**, 7-13.

McDonald JK., An Overview of Protease Specificity and Catalytic Mechanisms: Aspects Related to Nomenclature And Classification, *Histochem. J.*, 1985, **17**, 773-785.

Medeiros e Silva GM., Viana Marques D de A., Porto TS., Filho JLL., Teixeira JAC., Pessoa-Junior A., Porto ANF., Extraction of fibrinolytic Proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 Using PEG-Phosphate Aqueous Two-Phase Systems, *Fluid Phase Equilib*, 2013, **339**, 52-57.

Mohamadi HS., Omidinia E., Purification of Recombinant Phenylalanine Dehydrogenase by Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, *Journal of Chromatography B*, 2007, **854**(1-2), 273-278.

Mothe T., Sultanpuram VR., Production, Purification and Characterization of a Thermotolerant Alkaline Serine Protease from a Novel Species *Bacillus caseinilyticus*, *3 Biotech.*, 2016, **6**, 1-10.

Mótyán J., Tóth F., Tózsér J., Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology, *Biomolecules*, 2013, **3**, 923-942.

Muszevska A., Stepniewska-Dziubinska MM., Steczkiewicz K., Pawlowska J., Dziedzic A., Ginalski K., Fungal Lifestyle Reflected in Serine Protease Repertoire, *Scientific reports*, 2017, 7-1, 1-12.

Muthulakshmi C., Gomathi D., Kumar DG., Ravikumar G., Kalaiselvi M., Uma C., Production, Purification and Characterization of Protease by *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation, *Jordan J. Biol. Sci.*, 2011, **4**, 137-148.

Nascimento TP., Sales AE., Porto CS., Brandao RMP., De Campos-Takaki GM., Teixeira JAC., Porto TS., Porto ALF., Coverti A., Purification of a Fibrinolytic Protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by Aqueous Two-Phase Systems (PEG/sulfate), *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.*, 2016, **1025**, 16-24.

Niyonzima FN., More S., Detergent-compatible proteases: Microbial production, properties, and stain removal analysis, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2015, **45**, 233-258.

Ögel ZB., Yüzügüllü Y., Mete S., Bakir U., Kaptan Y., Sutay D., Demir AS., Production, Properties and Application to Biocatalysis of A Novel Extracellular Alkaline Phenol Oxidase from the Thermophilic Fungus *Scytalidium thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, **71**, 853-862.

Özcengiz G., Endüstriyel Üretimde Gen Teknolojileri, *Avrasya Dosyası, Moleküler Biyoloji ve Gen Teknolojileri Özel*, 2002, **8**(3), 104-119.

Özçömlekçi E., Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006, 222765.

Özden S., *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Aktivitesinin Tayini ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2014, 352613.

Padmapriya B., Rajeswari T., Nandita R., Raj F., Production and Purification of Alkaline Serine Protease from Marine *Bacillus* species and Its Application in Detergent Industry, *Eur. J. Appl. Sci.*, 2012, **4**, 21-26.

Raja S., Ramachandra V., Murty VR., Thivaharan V., Rajasekar V., Ramesh V., Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review *Science and Technology*, 2011, **1**(1), 7-16.

Rajput K., Chanyal S., Agrawal PK., Kumar P., Optimization of Protease Production by Endophytic Fungus, *Alternaria alternata* Isolated From Gymnosperm Tree-Cupressus Torulosa D.Don., *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2016, **5**, 1034-1054.

Rani K., Rana R., Datt S., Review on Latest Overview of Proteases, *Int. J. Curr. Life Sci.*, 2012, **2**, 12-18.

Rao MB., Tanksale AM., Ghatge MS., Deshpande VV., Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, **62**, 597-635.

Ratanapongleka K., Recovery of Biological Products in Aqueous Two Phase Systems, *Int. J. Chem. Eng.*, 2010, **1**, 191-198.

Rawlings ND., Twenty-Five Years of Nomenclature and Classification of Proteolytic Enzymes, *Biochim. Biophys Acta Proteins Proteom.*, 2020, **1868**, 140345.

Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A., Ashraf M., Microbial Proteases Applications, *Front Bioeng. Biotechnol.*, 2019, **7**, 1-20.

Reh G., Splenzini D., Tubio G., Pico G., Farruggia B., Partition Features and Renaturation Enhancement Of Chymosin In Aqueous Two Phase Systems, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 2007, **860**, 98-105.

Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A., Comparative Evaluation of Neutral Protease Production by *Aspergillus oryzae* in Submerged and Solid State Fermentation, *Process Biochem.*, 2005, **40**, 2689-2694.

Santos ALS., Braga-Silva LA., Aspartic Protease Inhibitors: Effective Drugs Against the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*, *Medicinal Chemistry*, 2013, **13**(1), 155-162.

Sanz Y., Toldrá F., Purification and Characterization of an X-Prolyl-Dipeptidyl Peptidase from *Lactobacillus sakei*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(4), 1815-1820.

Saraswathy N., Yeole GS., Parikh AJ., Meena C., Production and Optimization of Protease from *Bacillus licheniformis* NCIM 2044, *Asian J Pharma Life Sci.*, 2013; **3**, 9-15.

Sarı E., *Bacillus circulans* M34'ten Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2011, 327768.

Sarkar G., Suthindran K., Isolation and Bioprocess Optimization of Halophilic and Alkaline Protease from Marine Streptomyces and Its Use as Contact Lens Cleaner, 2020, 1-25.

Sawant R., Nagendran S., Protease : an Enzyme with Multiple Industrial Applications, *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2014, **3**, 568-579.

Shakilanishi S., Chandra Babu NK., Shanthi C., Exploration of chrome Shaving Hydrolysate as Substrate for Production of Dehairing Protease by *Bacillus cereus* VITSN04 for Use in Cleaner Leather Production, *J. Clean Prod.*, 2017, **149**, 797-804.

Shumi W., Hossain T., Anwar MN., Isolation and Purification of Fungus *Aspergillus funiculosus* G. Smith and its Enzyme Protease, *Pakistan J. Biol. Sci.*, 2004, **7**, 312-317.

Silva OS., Gomes MHG., de Oliveira RL., Porto ALF., Converti A., Porto TS., Partitioning and Extraction Protease from *Aspergillus tamaris* URM4634 Using PEG-Citrate Aqueous Two-Phase Systems, *Biocatal Agric. Biotechnol.*, 2017, **9**, 168-173.

Silva-López RE., Gonçalves RN., Therapeutic Proteases from Plants: Biopharmaceuticals with Multiple Applications, *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.*, 2019, **6**, 101-109.

Singh S., Gupta P., Bajaj BK., Characterization of a Robust Serine Protease from *Bacillus subtilis* K-1, *J. Basic Microbiol.*, 2017, 1-11.

Singh R., Mittal A., Kumar M., Mehta PK., Microbial Proteases in Commercial Applications, *J. Pharm. Chem. Biol. Sci.*, 2016, **4**, 365-374.

Siqueira JGW., Torres TMS, Alves BMV., Porto ALF., Porto TS., Extraction of Protease from *Aspergillus tamaris* URM 4634 in Aqueous Two-Phase System under Continuous and Discontinuous Process, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2020, **50**, 556-563.

Sonuc Karaboga MN., Logoglu E., Purification of Alkaline Serine Protease from Local *Bacillus subtilis* M33 by Two Steps: A Novel Organic Solvent and Detergent Tolerant Enzyme, *Gazi Univ. J. Sci.*, 2019, **32**, 116-129.

Sooch BS., Kauldhar BS., Puri M., Recent Insights into Microbial Catalases: Isolation, Production and Purification, *Biotechnol. Adv.*, 2014, **32**, 1429-1447.

Souza PM., Werneck G., Aliakbarian B., Siqueira F., Filho EXF., Perego P., Converti A., Magalhaes PO, Junior AP. Production, Purification and Characterization of an

Aspartic Protease from *Aspergillus foetidus*, *Food Chem. Toxicol.*, 2017, **109**, 1103-1110.

Sriket C., Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention, *Int. Food Res. J.*, 2014, **21**, 433-434.

Straatsma G., Olijnsma TW., Gerrits JP., Amsing JG., Op den Camp HJO., Van Griensven LJL., Inoculation Of *Scytalidium thermophilum* in Button Mushroom Compost and Its Effect on Yield, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 3049-3054.

Su CK., Chiang BH., Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system, *Process Biochem.*, 2006, **41**, 257-263.

Sun F., Hu Y., Yin X., Kong B., Qin L., Production, Purification and Biochemical Characterization of the Microbial Protease Produced by *Lactobacillus fermentum* R6 Isolated from Harbin Dry Sausages, *Process Biochem.*, 2020, **89**, 37-45.

Sunar K., Kumar U., Deshmukh SK., Recent Applications of Enzymes in Personal Care Products, *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production*, 2016, **12**, 279-298.

Taylor A., Aminopeptidases: Structure and Function, *FASEB J.*, 1993, **7**, 290-298.

Thirunavukkarasu N., Suryanarayanan TS., Rajamani T., Paranetharan MS., A Rapid and Simple Method for Screening Fungi for Extracellular Protease Enzymes, *Mycosphere*, 2017, **8**.

Tolan M., Mikrobiyal Kökenli Proteaz Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, 2015, 411280.

Tong L., Viral proteases, *Chem Rev.*, 2002, **102**, 4609-4626.

Tuomela M., Vikman M., Hatakka A., Itävaara M., Biodegradation of Lignin in A Compost Environment: A Review., *Biores. Technol.*, 2000, **72**, 169-183.

Turus N., Alkali Soğukta Aktif Proteaz Üreticisi *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Enzimin Biyoteknolojik Kullanım Olanakları, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2011, 275562.

Ul-Haq I., Mukhtar H., Umer H., Production of Protease by *Penicillium chrysogenum* Through Optimization of Environmental Conditions, *Journal of Agriculture & Social Sciences*, 2006, **2**(1), 23-25.

URL-1:https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d5/Proteolysis_uncat.svg (Ziyaret tarihi: 01 Haziran 2021)

URL-2 <https://conductscience.com/silverstaining-protocol>, (Ziyaret tarihi: 20 Nisan 2021).

Uyar F., Porsuk I., Kızıl G., Yılmaz EI., Optimal Conditions for Production of Extracellular Protease from Newly Isolated *Bacillus cereus* strain CA15, *EurAsian J. Biosci.*, 2011, **9**, 1-9.

Vapur UE., Farklı Rennet Orijinlerinin Peynir Üretiminde Kullanım Önerileri, Rennet Teknolojisindeki Gelişmeler ve Termolabil Mikrobiyal Rennetlere Bakış, *Akademik Et ve Süt Kurumu Dergisi*, 2021, **1**, 38-51.

Vidyasagar M., Prakash S, Litchfield C, Sreeramulu K, Purification and Characterization of a Thermostable, Haloalkaliphilic Extracellular Serine Protease from The Extreme Halophilic Archaeon *Halogeometricum borinquense* Strain TSS101, *Archea*, 2006, **2**, 51-57.

Waghmare SR., Gurav AA., Mali SA., Nadafa NE., Jadhav DB., Sonawaneab KD., Purification and Characterization of Novel Organic Solvent Tolerant 98 kDa Alkaline Protease from Isolated *Stenotrophomonas maltophilia* strain SK, 2015, **107**, 1-6.

Wiegant WM., Wery J., Buitenhuis ET., De Bont JAM., Growth-Promoting Effect of Thermophilic fungi on the mycelium of the Edible Mushroom *Agaricus bisporus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**, 2654-2659.

Yıldırım V., *Aeribacillus pallidus* C10'dan Alkalın Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliği, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2014, 376272.

Yücekan İ., İntervaz Enziminin Afiniteye Dayalı Teknikler ile Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2008, 216010.

Yücekan İ., Önal S. Partitioning of Invertase from Tomato in Poly(Ethylene Glycol)/Sodium Sulfate Aqueous Two-Phase Systems, *Process Biochemistry*, 2011, **46**, 226-232.

Zaslavsk BY., Aqueous Two-Phase Partitioning, *Physical Chemistry and Bioanalytical Application.*, 1995, **367**, 98-102.

Zengin M., *Scytalidium thermophilum* Katalaz-Fenol Oksidaz Enzimi Ana Kanal Yapısının Katalitik Aktivitedeki Rolünün Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2016, 436221.

Zheng L., Yu X., Wei C., Qiu L., Yu C., Xing Q., Fan Y., Deng Z., Production and Characterization of a Novel Alkaline Protease from a Newly Isolated *Neurospora crassa* Through Solid-State Fermentation, *Lwt.*, 2020, **122**, 108990.



EKLER

EK-A

Büyüme Ortamı Hazırlanması

Besiyeri 1 (YpSS Agar)

Maya ekstraktı, 4,0 g/L
K₂HPO₄, 1,0 g/L
MgSO₄.7H₂O, 0,5 g/L
Nişasta, 15,0 g/L
Agar 20,0 g/L

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su eklenir ve besiyeri sterilize edilmek üzere otoklavlanır.

Besiyeri 2 (YpSS Broth, %1 (a/h) glukoz)

Glukoz 1,0 g/L
MgSO₄.7H₂O 0,5 g/L
K₂HPO₄, 1,0 g/L
Maya ekstraktı, 4,0 g/L

Kimyasallar tartılır ve 1 litreye distile su yardımı ile tamamlanır. Sterilizasyon işlemi için düşük hacimlerde syringe filter kullanılabilir, büyük hacimler için besiyeri otoklavlanır.

Besiyeri 3 (YpSS Broth)

Glukoz 4,0 g/L
MgSO₄.7H₂O, 0,5 g/L
K₂HPO₄, 1 g/L
Maya ekstraktı, 4 g/L

Tartılan kimyasallar erlene eklenir ve distile su yardımıyla 1 litreye tamamlanır ardından sterilizasyon için otoklavlanır.

Solüsyonların Hazırlanışı

0,1 M Tris-HCl Tamponu (pH 8,0)

Tris 12,14 g/L

12,14 g kazein tartılır, üzerine 1 litre distile su eklenir ve karıştırıcıda yavaşça karışmaya bırakılır. Tris çözülmeye başladığında ortama 1 M HCl asit eklenerek solüsyonun pH'sı 8,0 olarak ayarlanır.

%1 (a/h) Kazein Solüsyonu

Kazein 10 g/L (pH 8,0)

1 g olarak tartılan kazeinin üzerine 100 mL 0,1 M'lık Tris-HCl solüsyonu eklenir ve 30 dk boyunca 60°C sıcaklıkta karışmaya bırakılır. Çözünen kazein solüsyonunun pH'sı 8,0 ayarlanır.

0,11 M TCA Solüsyonu

TCA (Trikloro Asetik Asit) 18 g/L

1,8 g olarak tartılan TCA'nın üzerine yavaşça 100 mL distile su eklenir ve karıştırılır.

Karışım tekrar kullanılmak üzere koyu renkli bir şişeye aktarılmalı ya da şişenin etrafı alüminyum folyo ile sarılmalıdır.

SDS-PAGE Jel Elektroforezi İçin Solüsyonlar

1,5 M Tris-HCl Tamponu (pH 8,8)

Tris Base 185 g/L

SDS 4 g/L

Kimyasallar 100 ml solüsyon hazırlanacak şekilde tartılır. Üzerlerine eklenir ve 80 ml distile su içerisinde çözdürülür, pH 10 M HCl solüsyonu ile 8,8 olarak ayarlanır. Solüsyon filtreden geçirilerek steril edilir ve +4°C'de saklanır.

1,0 M Tris-HCl Tamponu (pH 6,8)

Tris Base 125g/L

SDS 4 g/L

12,5 g Tris Base ve 0,4 g SDS tartılır, cam bir şişeye aktarılır. Yaklaşık 40 mL distile su ile çözülür ve üzerine 10 M HCl eklenerek pH'sı 6,8'e ayarlanır, karışım 100 mL'ye tamamlanır.

%10 (a/h) Amonyum Persülfat

APS 100 mg/mL

100 mg APS tartılır ve üzerine 1 mL ddH₂O eklenir. Karışım taze olarak kullanılmalıdır.

Ayrırma Jeli (%15, h/h)

%30 (h/h) Akrilamid 2,5 mL

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 1,25 mL

ddH₂O 1,175 mL

%20 (a/h) SDS 0,025 mL

% 10 (a/h) APS 0,050 mL

TEMED 0,005 mL

Yığıma Jeli (%5, h/h)

%30 (h/h) Akrilamid 830 µL

1,0 M Tris-HCl (pH 6.8) 630 µL

ddH₂O 3,4 mL

%20 (a/h) SDS 25 µL

% 10 (a/h) APS 50 µL

TEMED 5 µL

Örnek Dilüsyon Tamponu (Jel Yükleme Boyası) x4

SDS	0,8 g
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	2,5 mL
Gliserol	4 mL
β -mercaptoetanol	2 mL
Bromofenol mavisi	1 mg
ddH ₂ O	10 mL

Hazırlanan SDB (Örnek Dilüsyon Tamponu) uzun süreli kullanımlar için -80°C'de saklanmalıdır.

x10 Yürütme Tamponu (ERB) (25 mM Tris, 192 mM Glisin)

Tris	30 g/L
Glisin	144 g/L

15 g Tris ve 72 g Glisin tartılır ve son konsantrasyonları 500 mL olacak şekilde çözülür. +4°C'de saklanır.

x1 Elektrod Yürütme Tamponu

x10 ERB	100 mL
SDS	1 g/L

100 mL ERB solüsyonu alınır, üzerine 900 mL distile su eklenir. Karışıma 1 g SDS eklenir ve karıştırılır. Daha sonra jel elektroforez tankına aktarılır.

EK-B

Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama

Sabitlenme Solüsyonu (Fixer)

Metanol	50 mL
Asetik Asit	12 mL
Formaldehit (%37, h/h)	50 µL
Distile Su	37,5 mL

Metanol, asetik asit ve formaldehit karıştırılır ve üzerine distile su eklenerek 100 mL'ye tamamlanır.

%50 (h/h) Etanol

Saf Etanol	50 mL
Distile Su	50 mL

Distile su ve etanol karıştırılır, solüsyon taze olarak hazırlanmalıdır.

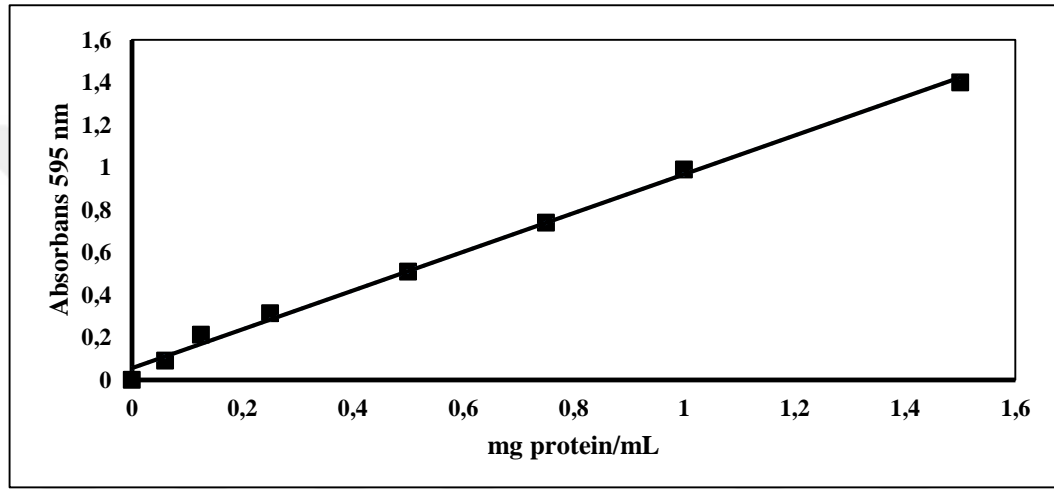
Ön İşlem Solüsyonu (Pretreatment Solution)

Sodyum tiosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,02 g

EK-C

Bovın serum albümin standart eğrisi

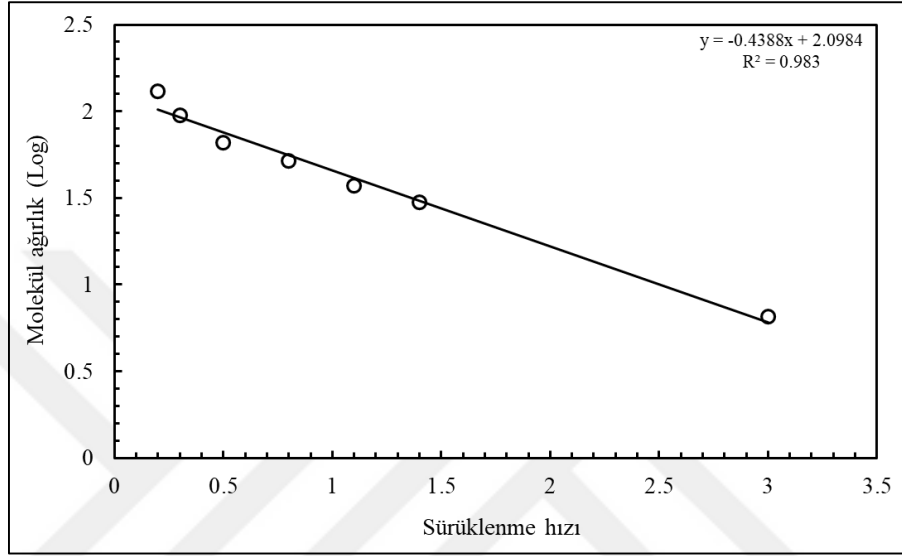
Protein standart eğrisinin hazırlanmasında standart protein olarak Sığır Serum Albumin (BSA) seçildi. Stok BSA çözeltisi (2 mg/mL) farklı oranlarda seyreltilmesinde (0, 0,1, 0,125, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 mg/mL) aynı tampon kullanıldı. 2 mL'lik ependorflar numaralandırıldı ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA çözeltilerinden 100 µL alındı, üzerine 1,5 mL Bradford reaktifi (Sigma, Bradford Ultra Protein Assay) 15 dk oda sıcaklığında bekletilen ependorflar daha sonra 595 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapıldı, standart eğri oluşturuldu.



Şekil C.1. Standart BSA eğrisi

EK-D

Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığının hesaplanması ve saflığının kontrolü için poliakrilamid jel elektroforezi gerçekleştirildi. Aşağıdaki grafikten yararlanarak örneğe ait moleküler ağırlık hesaplandı ve yaklaşık 80 kDa'na denk gelen tek bir bant gözlemlendi.



Şekil D.1. Moleküler ağırlık tayininde kullanılan grafik

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

İNCİ G.S., Termofilik Bir Mantar Olan *Scytalidium thermophilum*'dan Proteaz Üretiminin Optimizasyonu, *20. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi*, Ankara, Türkiye, 10-12 Ekim 2019.

POLAT F., DURGUN A., OLACAM A., **İNCİ G.S.**, DOĞAN M., UZUN E., IŞIK E., Kocaeli Üniversitesi Umuttepe Yerleşkesi'nde Yayılış Gösteren Kertenkelelerin Moleküler Düzeyde Tür Tayini, *Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2019, 2(1), 01-06.



ÖZGEÇMİŞ

İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2013 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümünü 2017'de bölüm üçüncüsü olarak bitirdi. 2017 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.

