

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

**PROTEİN ALERJİSİNE NEDEN OLMAYAN İNEK SÜTÜ ÜRETİMİ İÇİN
Bacillus licheniformis PROTEAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Derya ÖMEROSMANOĞLU
(153108003)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Yakup ASLAN
Ortak Danışman: Yrd. Doç. Dr. Eda ÖNDÜL**

**Nisan-2017
SİİRT**

TEZ KABUL VE ONAYI

Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Derya ÖMEROSMANOĞLU tarafından hazırlanan “**PROTEİN ALERJİSİNE NEDEN OLMAYAN İNEK SÜTÜ ÜRETİMİ İÇİN *Bacillus licheniformis* PROTEAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU**” adlı tez çalışması 28/04/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Yrd. Doç. Dr. Leyla EREN KARAHAN

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Yakup ASLAN

Üye

Yrd. Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.


Doç. Dr. Koray ÖZRENK
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2016-SİÜFEB-03 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında, bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

İmza

Derya Ömerosmanoğlu



Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasında, *Bacillus licheniformis* proteaz enzimi ilk olarak ticari immobilizasyon matrisi olan Eupergit CM üzerine kovalent bağlama yöntemiyle immobilize edildikten sonra karakterize edilmiş ve yarım yağlı UHT inek sütündeki proteinlerinin hidrolizinde kullanılmıştır.

Öncelikle, bu tez çalışmamı 2016-SİÜFEB-03 nolu proje ile destekleyen Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İkinci olarak, tez çalışmalarım boyunca kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Yakup ASLAN ve Siirt'te kaldığım süre içerisinde beni defalarca evinde ağırlayan değerli eşine ve ailesine teşekkür ederim.

Ayrıca, tez önerisi hazırlama aşamasından tez çalışmalarımın tamamlanmasına kadar desteğini esirgemeyen ortak danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Eda ÖNDÜL'E teşekkür ederim.

Öte yandan, lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca her türlü ilgisini, desteğini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın Doç. Dr. Koray ÖZRENK'E sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Aynı zamanda tüm çalışmalarım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca yardımlarını hiç esirgemeyen değerli gerek bölüm hocalarımın gerekse diğer bölümlerden hocalarımın destekleri ve yardımlarından ötürü kendilerine teşekkürü bir borç bilirim.

Derya ÖMEROSMANOĞLU
SİİRT-2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. İnek Sütü Proteinleri Alerjisi.....	3
2.2. İnek Sütünde Bulunan Alerjen Proteinler	3
2.3. Süt Proteinlerinin Hidrolizi	4
2.4. <i>Bacillus licheniformis</i> Proteaz.....	4
2.5. Enzim İmmobilizasyonu	4
2.6. Enzim İmmobilizasyon Metotları.....	6
2.6.1. Adsorbsiyon	6
2.6.2. Entrapment (Hapsetme).....	8
2.6.2.1. Enzimlerin kalsiyumların aljinat ile enzim immobilizasyonu	8
2.6.3. Çapraz bağlama	9
2.6.4. Kovalent bağlanma.....	9
2.6.4.1. Eupergit CM ile enzim immobilizasyonu	10
2.7. <i>Bacillus licheniformis</i> Proteazın İmmobilizasyonu İle İlgili Çalışmalar	12
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Materyaller	15
3.2. Metotlar	15
3.2.1. Protein tayini	15
3.2.1.1. Protein miktarının tayini	15
3.2.1.2. Proteinlerin sodyum dodesil sülfat-poli akrilamid gel elektroforez kullanılarak görüntülenmesi.....	16
3.2.2. L-Tirozin tayini	16
3.2.3. Proteaz aktivitesinin tayini	16
3.2.4. İmmobilizasyon şartlarının optimizasyonu	17
3.2.4.1. Matris miktarının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi.....	17
3.2.4.2. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi	17
3.2.4.3. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi.....	18

3.2.4.4. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi...	18
3.2.5. Serbest ve immobilize <i>Bacillus licheniformis</i> Proteazın karakterizasyonu	18
3.2.5.1. Optimum pH	18
3.2.5.2. Optimum sıcaklık	18
3.2.5.3. pH kararlılığı	19
3.2.5.4. Isıl kararlılık	19
3.2.5.5. Kinetik sabitler	19
3.2.5.6. Kullanım kararlılığı	20
3.2.5.7. Saklama kararlılığı	20
3.2.6. Süt Proteinlerinin hidrolizi	20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	21
4.1. Protein Tayini	21
4.1.1. Protein miktarının tayini	21
4.1.2. Proteinlerin sodyum dodesil sülfat-poli akrilamid gel elektroforez kullanılarak görüntülenmesi	22
4.2. Enzim Aktivitesinin Tayini	23
4.3. İmmobilizasyon Şartlarının Optimizasyonu	24
4.3.1. Matris miktarının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi	24
4.3.2. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi	24
4.3.3. İmmobilizasyon tamponu molaritesinin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi	25
4.3.4. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi	26
4.4. Sıvı ve Immobilize <i>Bacillus licheniformis</i> Proteazların Karakterizasyonu	27
4.4.1. Optimum pH	27
4.4.2. Optimum sıcaklık	28
4.4.3. pH kararlılığı	29
4.4.4. Isıl kararlılık	29
4.4.5. Kinetik sabitler	30
4.4.6. Kullanım kararlılığı	31
4.4.7. Saklama kararlılığı	31
4.4.8. Süt Proteinlerinin hidrolizi	32
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
5.1. Sonuçlar	35
5.2. Öneriler	35
6. KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	41

TABLULAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Adsorbsiyonla immobilizasyonda kullanılan adsorbentler	7
Tablo 4.1. Eupergit CM miktarının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi.....	25
Tablo 4.2. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi	25
Tablo 4.3. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi	26
Tablo 4.4. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi.....	26





ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Enzim immobilizasyon metotları	7
Şekil 2.2. Aljinat polimerlerinin molekül yapısı. G: Gluronik asit, M: Mannuronik asit	9
Şekil 2.3. Eupergit CM ile enzim immobilizasyonu	11
Şekil 4.1. BSA standart grafiği	21
Şekil 4.2. İmmobilizasyon öncesi ve sonrası enzimin SDS-PAGE elektroforez görüntüsü. (1) İşaretçi proteinler (molekül kütlesi birimi kDA'dır), (2) İmmobilizasyon süzöntüsü, (3) İmmobilizasyon çözeltisi,	22
Şekil 4.3. L-Tirozin standart grafiği.....	23
Şekil 4.4. Serbest ve immobilize <i>Bacillus licheniformis</i> proteazın optimum pH'SI.	27
Şekil 4.5. Serbest ve immobilize <i>Bacillus licheniformis</i> proteazın optimum sıcaklığı.....	28
Şekil 4.6. Serbest ve immobilize <i>Bacillus licheniformis</i> proteazın pH kararlılığı.....	29
Şekil 4.7. Serbest ve immobilize <i>Bacillus licheniformis</i> proteazın ısıl kararlılığı.....	30
Şekil 4.8. Serbest ve immobilize <i>Bacillus licheniformis</i> proteazın Linewaver Burk grafiği.	31
Şekil 4.9. İmmobilize <i>Bacillus licheniformis</i> proteazın kullanım kararlılığı.....	32
Şekil 4.10. İmmobilize <i>Bacillus licheniformis</i> proteazın saklama kararlılığı	32
Şekil 4.11. İmmobilize <i>Bacillus licheniformis</i> proteaz kullanılarak yarım yağlı UHT inek sütü proteinlerinin hidrolizi.....	33
Şekil 4.12. Hidroliz öncesi ve sonrasında yarım yağlı UHT inek sütündeki proteinlerin SDS- PAGE elektroforez görüntüsü. (1) İşaretçi proteinler (molekül kütlesi birimi kDA'dır), (2) Proteinleri hidrolize yarım yağlı UHT inek sütü, (3) Yarım yağlı UHT inek sütü	33

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μmol	: Mikromol
$^{\circ}\text{C}$: Celsius
BSA	: Bovine Serum Albumin
g	: Gram
IU	: Uluslararası Enzim Birimi
L	: Litre
M	: Molarite
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
pH	: $-\log[\text{H}^+]$
rpm	: Dakikadaki dönme sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	: Poli Akrilamid Gel Elektroferez
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Gel Elektroferez
UHT	: Ultra Yüksek Sıcaklık
UV	: Ultraviyole
v	: Hacim
w	: Kütle



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROTEİN ALERJİSİNE NEDEN OLMAYAN İNEK SÜTÜ ÜRETİMİ İÇİN *Bacillus licheniformis* PROTEAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU

Derya ÖMEROSMANOĞLU

Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Yakup ASLAN

II. Danışman : Yrd. Doç. Dr. Eda ÖNDÜL

2017, 42 Sayfa

Bebekler arasındaki en yaygın alerji inek sütü proteini alerjidir ve tüm bebeklerin% 2-5'inde görülür. Proteinsiz inek sütü tüketimiyle, bu yaygın problem büyük ölçüde azaltılabilir. Bu tez çalışmasında, *Bacillus licheniformis* proteazının immobilizasyonu, ticari immobilizasyon matrisi Eupergit CM üzerine kovalent bağlama ile gerçekleştirildi. Hareketsizleştirme koşullarını optimize ederek, % 100 immobilizasyon ve % 107,7 aktivite verimleri elde edildi. Enzim optimum pH aralıkları (7-8) ve enzimin optimum sıcaklığı (70 °C) immobilizasyon sonrasında değişmemiştir. Serbest ve immobilize enzimin kinetik sabitleri ayrıca Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak belirlendi. Serbest ve immobilize enzimin substrat olarak kazein için K_m değerleri 0,0387 ve 0,0269 g/L iken, V_{max} değerleri sırasıyla 2,95 ve 3,38 g L-Tirozin/L.dk'dır. Immobilize enzim, tekrarlanan yirmi kullanım sırasında ve yirmi günlük depolama sırasında başlangıç aktivitesini kaybetmemiştir. Immobilize enzim kullanılarak, yağsız inek sütü proteinleri, 200 rpm çalkalama hızındaki orbital çalkalayıcı ve ısıtılmalı bir inkübatörde optimum sıcaklıkta, iki saat boyunca hidrolize edilmiştir. Proteinlerin hidrolizinin 120 dakikada tamamlandığı gösterilmiştir. Ayrıca, proteinleri hidrolize yağsız sütün rengi, proteinlerin hidrolizinden dolayı, işlenmemiş süttten daha berrak iken, pH'ın 6,89'dan 6,53'e düştüğü de gösterilmiştir. Sonuç olarak, immobilize *Bacillus licheniformis* proteazın, protein alerjisine neden olmayan inek sütünün endüstriyel üretiminde kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Eupergit CM, Immobilizasyon, İnek Sütü, Proteaz, Protein, Protein Alerjisi



ABSTRACT

MS THESIS

IMMOBILIZATION OF *Bacillus licheniformis* PROTEASE ENZYME FOR THE PRODUCTION OF COW'S MILK NOT CAUSE TO PROTEIN ALLERGY

Derya ÖMEROSMANOĞLU

The Graduate School of Natural and Applied Science of Siirt University
The Degree of Master of Science Philosophy
Food Engineering

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Yakup ASLAN

Co-Supervisor : Asst. Prof. Dr. Eda ÖNDÜL

2017, 42 Pages

The most common allergy among infants is the cow's milk protein allergy and occurs in 2-5 % of all infants. With the consumption of the protein-free cow's milk, this widespread problem can be greatly reduced. In this thesis study, immobilization of *Bacillus licheniformis* protease was performed by covalent binding on the commercial immobilization matrix Eupergit CM. By optimizing the immobilization conditions, 100 % immobilization and 107,7 % activity yields were achieved. The optimum pH ranges (7-8) and optimum temperature (70 °C) of the enzyme has not changed after immobilization. Kinetic constants of the free and immobilized enzyme were also determined using the Lineweaver-Burk plot. The K_m values for casein as substrates for free and immobilized enzyme were 0,0387 and 0,0269 g / L, while the V_{max} values were 2,95 and 3,38 g L-Tyrosine / L.min respectively. The immobilized enzyme has not lost its initial activity during repeated twenty uses and twenty days of storage. Using the immobilized enzyme, semi-skimmed cow's milk proteins were hydrolyzed for two hours at the optimum temperature in an orbital shaken and heated incubator at 200 rpm shaking speed. Protein hydrolysis has been shown to be complete within 120 minutes. It has also been shown that the pH of the hydrolyzed semi-skimmed cow's milk is clearer than the unprocessed milk due to the hydrolysis of proteins, while the pH drops from 6,89 to 6,53. As a result, immobilized *Bacillus licheniformis* protease has been suggested to be used in the industrial production of cow's milk which does not cause protein allergy.

Keywords: Allergy, Eupergit CM, immobilization, milk, protease, protein

1. GİRİŞ

İmmobilize enzimler gıda biyoteknolojisinde onlarca yıldan beri yaygın olarak kullanılmaktadır. İmmobilizasyon, enzimlerin suda çözünmeyen bir polimerin üzerine veya içerisine kimyasal bağlanma ile bağlanarak çözünmez hale getirilmesidir. Çapraz bağlama, adsorpsiyon, entrapment ve kovalent bağlama yöntemleri ile günümüze kadar çok sayıda endüstriyel enzim immobilize edilerek kullanılmaktadır. İmmobilize enzim kullanmanın, süzerek reaksiyon ortamından ayrılmasıyla yüzlerce defa kullanılması, düşük ürün maliyeti, daha saf ürün üretimi gibi avantajları bulunmaktadır.

İnek sütü proteini alerjisi, anne sütü alamayan bebeklerde sık görülen alerjidir. Genellikle, 5 yaşına kadar olan çocuklardan sadece anne sütü ile beslenenlerin % 0,5'i ve mamalarla beslenenlerin ise % 2-5'inde görülmektedir.

Proteazlar, proteinleri hidroliz ederek peptit ve amino asit oluşturan enzimlerdir. Bu tez çalışmasının en büyük varsayımı, bir alkalın proteaz olan *Bacillus licheniformis* proteaz enziminin inek sütü proteinlerinin hidroliz edilerek protein alerjisine neden olmayan inek sütü üretiminde kullanılabileceği tezidir. Ancak, suda çözülmüş haldeki enzimlerin kullanılmasının dezavantajları nedeniyle, bu tez çalışmasında *Bacillus licheniformis* proteaz enziminin ticari immobilizasyon matrisi Eupergit CM üzerine kovalent bağlama yöntemiyle immobilizasyon koşulları optimize edilerek, mümkün olan en yüksek bağlanma ve aktivite verimleriyle immobilize edilecek ve yarım yağlı UHT inek sütü proteinlerinin hidrolizinde kullanılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. İnek Sütü Proteinleri Alerjisi

İnek sütü protein alerjisi (İSPA), inek sütü proteinlerine karşı vücutta oluşturulan immünolojik reaksiyonlardır (Koca ve Akçam, 2015). Bebeklerde görülen en sık alerji, inek sütü alerjisidir. İnek sütü alerjisinin neden geliştiği tam olarak bilinmemekle birlikte, bebeğin inek sütü proteini tüketmemesinin, belirtileri engellediği bilinmektedir.

İnek sütü alerjisinin belirtileri değişkendir. Cilt, solunum yolları ve sindirim sistemi gibi birkaç sistemi etkileyebilir. Alerji belirtileri arasında deri döküntüleri (kurdeşen), egzama, hırıltılı solunum, kusma, ishal, kolik veya aşırı ağlama sayılabilir. Alerjik tepkiler birkaç dakika içerisinde çok hızlı ortaya çıkabileceği gibi (ör. şiddetli solunum sorunları, kusma) geç de oluşabilirler veya ortaya çıkmaları için büyük bir porsiyon tüketilmesi gerekebilir (ör. bir bardak süt). Ortaya çıkması 3-5 gün alabilen deri döküntüsü veya ishal gecikmiş tepki örnekleridir. İnek sütü alerjisi nedeniyle daha geç oluşan reaksiyonlar arasında, atopik dermatit, kronik ishal, dışkıda kan, demir eksikliği anemisi, gastroözofageal reflü hastalığı, kabızlık, kronik kusma, kolik, zayıf büyüme (gıda reddi), enterokolit sendromu yer almaktadır (Caffarelli ve ark., 2010).

İnek sütü proteini alerjisi 100 bebekten 2-5'inde bulunmakta ve genellikle 2-3 yaş altı bebekleri etkilemektedir (Anonim, 2016). 2012 yılında Dünya genelinde 138.314.000 bebeğin doğduğu (Anonim, 2014) göz önüne alındığında, inek sütü proteinleri alerjisinin boyutları daha iyi anlaşılacaktır. Protein hidrolizatları içeren inek sütünün tüketilmesinin, bu yaygın problemin çözümüne büyük katkı sağlayacağı söylenebilir.

2.2. İnek Sütünde Bulunan Alerjen Proteinler

İnek sütünün en az 20 protein bileşeni bebeklerde alerjiye neden olmaktadır (Wal, 1998). İnek sütü proteinleri % 80 kazein ve % 20 peynir altı suyu proteinlerinden oluşmaktadır. Kazein proteinleri α -s, α -s1, α -s2, β -, κ , κ -kazein ve γ -kazein fraksiyonlarından oluşmaktadır. Peynir altı suyu proteinleri ise β -laktoglobulin, α -laktalbumin, sığır serum albumini, immünglobulinler, proteaz-peptonlar, mineral maddeler, vitaminler, enzimler ve küçük miktarlarda çeşitli proteinler (laktoferin, transferin, lipaz, esteraz) fraksiyonlarını içermektedir. Bebekte genellikle birden fazla

proteine karşı duyarlılık gelişmektedir; en yaygın görülen protein alerjileri kazein, β -laktoglobulin, α -laktalbumin fraksiyonlarından kaynaklanmaktadır (Chatchatee ve ark., 2001). Kaynatma, pastörizasyon sıcaklıklarına ve evaporasyon işlemine dayanıklı olan süt alerjen proteinleri, bu işlemler sonrasında da biyolojik aktivitelerini korumaktadırlar (Chatchatee ve ark., 2001; Fiocchi ve ark., 2010).

2.3. Süt Proteinlerinin Hidrolizi

Literatürde, çözüner veya immobilize formda proteaz enzimi kullanılarak serum proteinlerinin hidrolizi ile ilgili bir kaç çalışma (Kaminogawa ve Yamauchi, 1972; Kaminogawa ve ark., 1980; Tavarria ve ark., 1997; Trujillo ve ark., 1998; Eigel ve ark., 1979; Coşkun ve Sienkiewicz, 2009; Elfahri, 2012; Behbahani ve ark., 2013; Szélpál ve ark., 2013) bulunmasına karşın, inek sütü içerisindeki proteinlerin proteaz kullanılarak süt içerisinde hidrolizi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla bu tez çalışmasında, *Bacillus licheniformis* proteaz enzimi önce immobilize edilmiş, sonra da immobilize enzim kullanılarak optimum koşullarda yarım yağlı UHT inek sütü proteinleri tamamen hidroliz edilmeye çalışılacaktır.

2.4. *Bacillus licheniformis* Proteaz

Bacillus licheniformis proteaz (E.C.3.4.21.14), tarihsel olarak bazı endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılması nedeniyle çok değerli bir enzimdir. Aktif bölgeleri aspartik asit, histidin ve serin amino asitlerinden oluşur. Yüksek sıcaklık ve alkalın pH'lardaki yüksek kararlılığı, diğer proteazlar üzerinde üstünlük kazanmasına neden olmuştur (Gupta ve ark., 2002; Kumar ve ark., 2008). Diyet takviyeleri üretimi, yiyecek içecek üretim prosesleri, gıda bileşenlerinin geliştirilmesi ve proteinlerin işlenmesi gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (Nazari ve ark., 2016).

2.5. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler biyolojik katalizörlerdir ve kimyasal katalizörlerin aksine doğaldırlar. Bunlar, kompleks bileşiklerin hızlı sentezi, yüksek moleküler ağırlıklı yapıların bozunması ve biyomoleküllerin aktif durumuna dönüştürülmesini içeren, yaşam için temel kimyasal reaksiyonları katalizleyen polimerlerdir. Enzimler, çok daha büyük katalitik güce sahip olup, diğer kimyasal katalizörlerden daha üstündür ve kiral olmayan

substratları kiral ürünlere dönüştürme özelliği ile stereo özelliklidir ve bu özellikler gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Dahası, enzimler son derece özgüdür ve bazılarında mutlak özgüllük bile görülür. Birkaç katalitik RNA molekülü hariç, enzimlerin çoğu protein yapısındadırlar. Gıda endüstrisinde kullanılan bütün enzimler doğada protein olup, gıda teknolojisi uzmanları normal olarak onları yiyecek üretiminde, işlenmesinde ve hazırlamasında kullanılmaktadırlar (Raghul Subin ve Bhat, 2016). Gıda işleme endüstrisinde enzimlerin kullanımı bira, ekmeğin pişirme, peynir ve şarap yapma ve sirke üretimi ile M.Ö. 6000 yılına kadar uzanmaktadır. (Poulsen ve Buchholz, 2003). Biyoteknolojideki gelişmeler sonucu günümüzde ilaç ve kimya endüstrisinde de uygulama alanları bulmuşlardır.

Endüstride enzimlerin doğal formlarıyla kullanılmasının önemli dezavantajları vardır. Örneğin, aynı enzim örneği ya bir kere kullanılmakta ve ürünle birlikte tüketime sunulmakta veya tekrar kullanılması için pahalı teknikler kullanılarak üründen ayrılabilmediğinden, ürünün maliyeti yükselmektedir. Bir diğer dezavantajı ise, pH ve sıcaklıktaki değişimlere, kullanım şartlarına ve saklama şartlarına bağlı olarak, aktivitelerinde önemli kayıpların meydana gelmesidir.

Bu dezavantajların giderilmesi için ilk yaklaşım, suda çözünen stabilizatörler ilave etmek olmuştur. Metaller, surfaktanlar, polioller, polietilenglikoller, proteinler, aminoasitler ve bazı şekerler ilave edilerek enzimlerin aktiviteleri kararlı hale getirilmiştir. Bu kararlılık katkısı, enzim ve çözücü arasında non-kovalent etkileşimlerin bir sonucudur (Drevon, 2002). Ancak bu yöntem, aynı enzim örneğinin çok defa fazla kullanılması yönünde herhangi bir katkıda bulunmaz.

Diğer bir yaklaşım ise enzim immobilizasyonudur. Immobilizasyon, enzim aktivitesini uzun süre korumak için, suda çözünmeyen bir matrise adsorbsiyon, kovalent bağlanma veya matris içine hapsederek enzimin hareketinin sınırlandırılmasıdır. Enzim immobilizasyonunda organik ve inorganik yapıda çok sayıda doğal veya yapay matris kullanılmaktadır. Eupergit CM ve kalsiyum aljinat ($C_6H_7O_6Ca$)_n, yaygın olarak kullanılan matrislerdendir.

İmmobilize enzimler, kullanılan matrisin yapısına ve kullanılan immobilizasyon metoduna bağlı olarak, serbest enzimlere göre farklı özellikler gösterirler. İmmobilize enzimin optimum şartları, kinetik sabitleri ve ürün bileşimleri serbest enzime göre farklılık gösterebilir.

İmmobilize enzim kullanımının faydaları aşağıda gösterilmiştir:

- ✓ Reaksiyon ortamından basit yöntemlerle ayrılabilir,
- ✓ Yüksek sıcaklık ve ekstrem pH'lara karşı daha dayanıklıdır,
- ✓ Sürekli proseslerin uygulanmasını mümkün kılar,
- ✓ Defalarca kullanılabilir,
- ✓ Optimum saklama koşullarında aktivitelerini aylarca koruyabilir,
- ✓ Ürün maliyetini düşürür,
- ✓ Saf ürün eldesini mümkün kılar,
- ✓ Enantiyomerlerin seçici olarak sentezi mümkün olur,
- ✓ Ürün inhibisyonu önlenebilir.

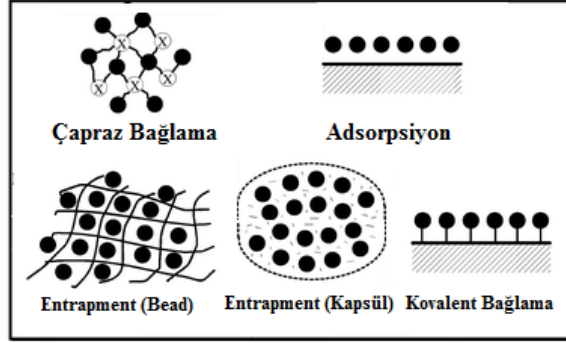
İmmobilizasyon çalışmaları 1960'ların ilk yarılarında başlamış ve günümüze kadar konu ile ilgili olarak, 10.000'in üzerinde makale ve patent yayınlanmıştır. Tosa ve arkadaşları (1966), tarafından Japonya'da İmmobilize *Aspergillus oryzae* aminoasitler kolonlarının geliştirilmesi ve sentetik rasemik D- ve L- aminoasitlerin aktif enantiyomerlere dönüştürülmesinde kullanılması, immobilize enzimlerle ilgili ilk endüstriyel uygulamadır.

2.6. Enzim İmmobilizasyon Metotları

İmmobilizasyon metotları genellikle, bağlanma reaksiyonunun tipine göre sınıflandırılır. Buna göre, enzim immobilizasyon metotları başlıca dört ana grupta toplanır: Adsorbsiyon, entrapment (bir polimerik jel veya kapsül içine hapsedme), çapraz bağlama ve kovalent bağlamadır (Şekil 2.1).

2.6.1. Adsorbsiyon

Adsorbsiyon metodu, enzimin en zayıf çekim kuvvetleriyle inert bir matrise fiziksel veya iyonik olarak bağlanmasıdır (Messing, 1976; Woodward, 1985). Adsorbsiyon oldukça basit ve ekonomik bir immobilizasyon yöntemidir. İmmobilizasyon, enzim çözeltisinin uygun pH ve sıcaklıkta matrisle karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Enzimle matris arasında zayıf bağlar (Van der Waals ve Hidrojen Bağları) oluşur ve enzimler matristen kolaylıkla ayrılırlar. İyon değiştiriciler kolaylıkla proteinleri adsorbe ederler ve enzim immobilizasyonu için endüstride yaygın olarak kullanılırlar. Tablo 2.1'de, adsorbsiyon için kullanılan adsorbentler yer almaktadır.



Şekil 2.1. Enzim immobilizasyon metotları.

Tablo 2.1. Adsorbsiyonla immobilizasyonda kullanılan adsorbentler

Etkileşme	Adsorbentler
Fiziksel Adsorbsiyon	Doğal Matrisler
	Aktif Karbon Silika Jel Alumina Cam Nişasta
İyonik Bağlanma	Modifiye Matrisler
	Concanavalin A Sepharose Tannin Amino heksil selüloz Fenoksiasetil selüloz
İyonik Bağlanma	Kasyon Değişiriciler
	CM-selüloz Dowex 50 Amberlite CG-50
İyonik Bağlanma	Anyon Değişiriciler
	DEAE-selüloz DEAE-sepadex Amberlite

2.6.2. Entrapment (Hapsetme)

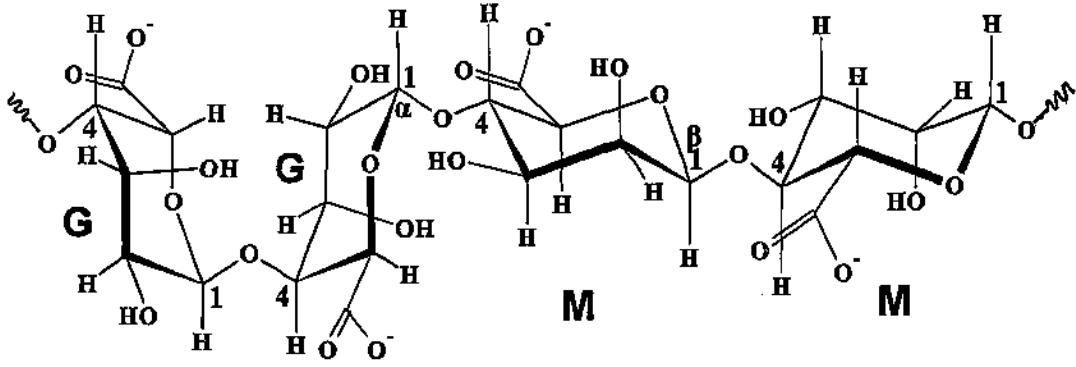
Bir polimerin oluşumu sırasında, enzimin oluşan polimer içinde hapsedilmesine entrapment denir (O'Driscoll, 1976). Bu metot için en yaygın olarak kullanılan polimerlerden birisi aljinik asittir.

2.6.2.1. Enzimlerin kalsiyumların aljinat ile immobilizasyonu

Aljinatlar, kahverengi deniz yosunlarından (*Phaeophyceae*, başlıca *Laminaria hyperborea*) elde edilen, α -(1 →4)-L-gluronik asit (G) ve β -(1 →4)-D-mannuronik asit (M) birimlerinden oluşmuş anyonik, lineer bir polisakkarittir (Smidsrod ve Skjak-Braek, 1990; Blandino ve ark., 2000). Aljinat molekülünün kimyasal yapısı Şekil 2.2'de görülmektedir. Aljinat moleküllerinde bulunan G ve M monomerlerinin oranı ve dizilişi, aljinatın elde edildiği kaynağa göre değişmektedir. Aljinatlar sulu çözeltilerinde, Ca^{+2} gibi iki değerlikli katyonlarla iyonik bağlanma yaparak jel oluştururlar. Jel oluşumu, farklı aljinat zincirlerindeki G'lerin karboksil grupları ile Ca^{+2} iyonları arasındaki kooperatif bağlanma sonucu gerçekleşir.

Aljinat kullanılarak enzimler değişik metotlarla immobilize edilebilir. Enzim, aljinat çözeltisiyle karıştırılarak kalsiyum klorür çözeltisine damlatıldığında kalsiyum aljinat beadleri oluşur. Enzim, kalsiyum klorür ile karıştırılarak aljinat çözeltisine damlatıldığında ise kalsiyum aljinat kapsülleri oluşur. Enzim-Aljinat-gliserol karışımı, kalsiyum klorür çözeltisine şırınga ile iplik şeklinde enjekte edildiğinde, kalsiyum aljinat fiberleri oluşur. Oluşan bead, fiber veya kapsülün gözenek büyüklüğü, kullanılan aljinat ve kalsiyum klorür çözeltisinin derişimine bağlıdır. Molekül kütlesi 300 kDA'dan küçük olan enzimler aljinat jellerinden kaçabilmektedir. Bu nedenle, kalsiyum aljinat ile immobilizasyon genellikle hücrelerin immobilizasyonunda kullanılır. Aljinat ve kalsiyum klorür derişimleri optimize edilerek, enzimler de aljinat içerisinde bu üç yöntemden birisi ile immobilize edilmiştir. (Blandino ve ark., 2000; Hayashi ve ark., 1994).

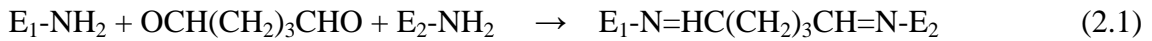
Aljinatlar, toksik olmayan doğal polimerlerdir ve ekonomik olarak elde edilmektedir. Aljinat jellerinin (bead, kapsül, fiber) gözeneklerinin büyük olması, fosfat gibi bazı anyonlar içeren reaksiyon ortamlarında kararlılığının düşük olması, kullanılmalarını sınırlayan faktörlerdir.



Şekil 2.2. Aljinat polimerlerinin molekül yapısı. G: Gluronik asit, M: Mannuronik asit

2.6.3. Çapraz bağlama

Sulu çözeltilerde çözünebilen enzimler, bifonksiyonel çapraz-bağlayıcı reaktifler kullanılarak birbirine kovalent olarak bağlandıklarında çözünmez hale gelirler. (Chui ve Wan, 1997). Glutaraldehit bu amaç için kullanılan çapraz-bağlayıcı reaktiflerdendir (Klibanov, 1979). Bifonksiyonel glutaraldehit molekülündeki aldehit grupları, enzimlerin amino gruplarıyla reaksiyona girerek enzimleri çapraz bağlar. Çapraz bağlanma moleküller arası veya molekül içi oluşabilir ve protein çöker. Çapraz bağlı protein santrifüj ile kolaylıkla ayrılabilir.



2.6.4. Kovalent bağlama

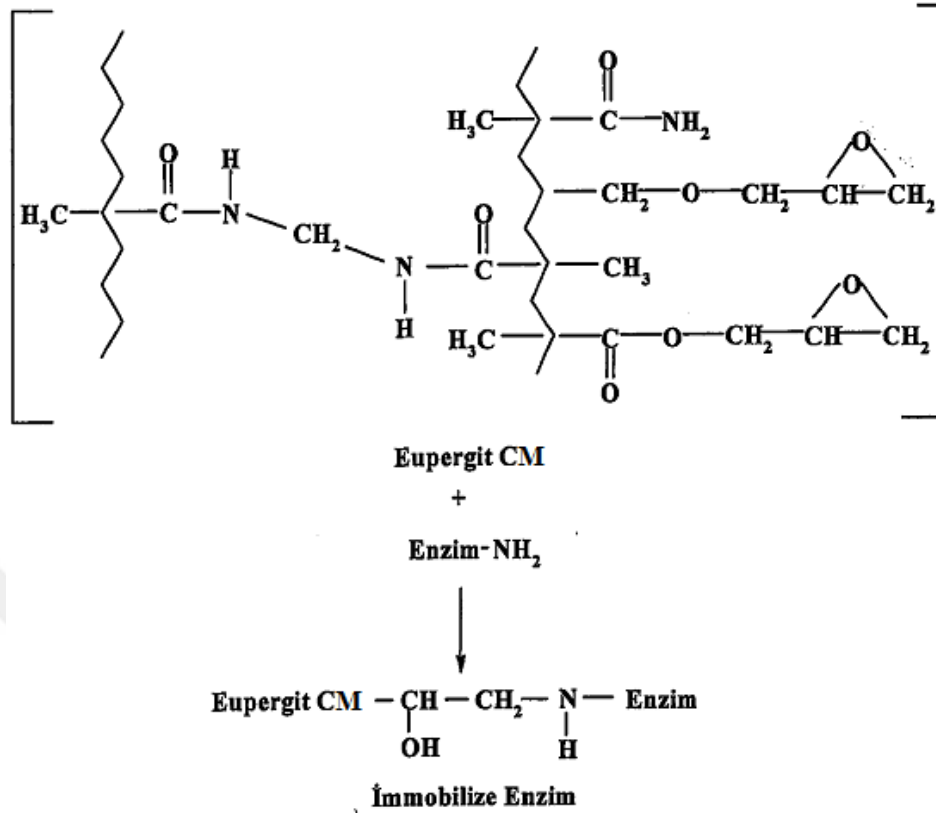
Proteinlerin kovalent bağların oluşumuna dayanan yöntemlerle immobilizasyonu en çok kullanılan maddeler arasındadır. Bu yöntemlerin bir avantajı, enzim ve matris arasında oluşan bağların istikrarlı doğası nedeniyle, enzim kullanım üzerine çözeltiliye salınmaz. Bununla birlikte, yüksek düzeyde bağlanmış etkinlik elde etmek için, katalitik aktivite için gerekli olan amino asit kalıntıları, matrise kovalent bağlantıya dahil edilmemelidir. Bu, bazı durumlarda yerine getirilmesi zor bir gereklilik olduğunu kanıtlayabilir. Bazen aktivite verimi geliştiren basit bir prosedür substrat analogları (Mattiasson, 1991) varlığında birleştirme reaksiyonu yapmaktır. İmmobilizasyon için kovalent yöntemler, üründe enzim bulunmaması için sıkı bir gereklilik olduğunda kullanılır.

Matris üzerinde bulunan fonksiyonel gruplara bağı olarak çok çeşitli reaksiyonlar geliştirilmiştir (Scouten, 1987). Birleştirme yöntemleri genel olarak iki ana sınıfa ayrılabilir: (1) bir polimere reaktif bir fonksiyon eklenerek matrisin aktivasyonu ve (2) aktive edilmiş bir grup üretmek için polimer omurgasının değiştirilmesi.

2.6.4.1. Eupergit CM ile enzim immobilizasyonu

Eupergit C, üzerinde reaktif epoksi grupları bulunan ve biyomoleküllerin immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan matristir. Gözenekli beadlerden ibaret bir matris olan Eupergit C, metakrilamid, allilglisidil eter ve N,N'-metilen-bis-akrilamidin ko-polimerizasyonu ile oluşturulur. Eupergit C kimyasal ve mekanik olarak, 1-12 pH aralığında kararlıdır. Mikrobiyal bozunmalara karşı da oldukça dayanıklıdır. Tüm reaktörlerde kullanılabilir (Katchalski-Katzir ve Kraemer, 2000; Roehm, 05/95).

Eupergit C'nin epoksi grupları (600 µmol/g kuru Eupergit C), nötral ve bazik pH'larda enzimlerin amino, sülfidril ve karboksil grupları ile kovalent olarak bağlanabilmektedir. Eupergit C, asidik, nötral ve bazik pH'larda, enzimlerin sülfidril ve karboksil gruplarına da bağlanabilmektedir. Şekil 2.3.'de, enzimlerin amino grupları ile Eupergit C'nin epoksi grupları arasındaki kovalent bağlanma görülmektedir. Eupergit C'ye bağlanan çok sayıda enzimin pH ve termal kararlılığı artmakta ve uzun süre aktivitesini korumaktadır. Eupergit C ile immobilizasyon sonucunda enzimlerin optimum pH ve sıcaklıkları ile kinetik sabitleri değişebilmektedir (Katchalski-Katzir ve Kramer, 2000). Eupergit CM de benzer kimyasal yapıya sahip olduğu için Eupergit C'ye benzer özellikler taşımaktadır.



Şekil 2.3. Eupergit CM ile enzim immobilizasyonu

İmmobilizasyonda, matrise bağlanan enzim miktarının başlangıçta kullanılan enzim miktarına oranı immobilizasyon verimi olarak tanımlanır. Aktivite verimi ise, immobilizasyon süzütüsünde kalan enzimin aktivitesi arasındaki farka oranı olarak tanımlanır.

Eupergit C ve enzim miktarı, immobilizasyon çözeltisinin pH'sı, immobilizasyon çözeltisinin molaritesi ve bağlanma süresi, bağlanma verimi ve aktivite verimini oldukça etkilemektedir. Yapılacak bir immobilizasyon çalışmasında bu şartların optimize edilmesi gerekmektedir. Endüstriyel potansiyele sahip çok sayıda enzim, genellikle % 80'in üzerinde bir verimle Eupergit C üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir (Roehm, 05/95). Epoksi grubu taşıyan matrisler ile yapılan bazı immobilizasyon çalışmalarında, immobilizasyondan sonra enzimin aktivitesinde anlamlı derecede artışlar elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, *Streptomyces levandulea* ATCC 13664 penisilin V açılaz enzimi Eupergit C üzerine % 144 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir (Torres-Bacete ve ark., 2000). Yapılan diğer bir çalışmada,

Aspergillus aculeatus β -Galaktozidazı Eupergit C üzerine % 124 verimle immobilize edilmiştir (Aslan ve Tanrıseven, 2007). Başka bir çalışmada, Aslan ve ark. (2014) *Pseudomonas fluorescens* lipaz enzimini Eupergit CM üzerine % 170 verimle immobilize etmişlerdir.

2.7. *Bacillus licheniformis* Proteazın İmmobilizasyonu İle İlgili Çalışmalar

Literatürde, *Bacillus licheniformis* proteaz enziminin immobilizasyonu ile ilgili bir kaç çalışma bulunmaktadır.

Ferreira ve ark., (2003)'nın yaptığı çalışmada, *Bacillus licheniformis* proteaz (Subtilisin Carlsberg), 3-aminopropiltrioksolan ile silanlaştırılan ve glutaraldehit ile aktifleştirilen silis jelleri üzerine % 31.1 immobilizasyon ve % 31,6 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir. İmmobilize enzimin optimum pH (8,0) ve sıcaklığı (60 °C) immobilizasyondan etkilenmezken, K_m sabitinin değeri serbest enzime göre azalmıştır. Ayrıca immobilize enzimin aktivitesi tekrarlanan beş kullanım sonunda % 15-25 azalırken, optimum saklama koşullarında aktivitesinin % 86'sını korumuştur.

Silva ve ark. (2006) ise, *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen Alkaline Proteaz Esperazı karbodiimid ile kaplanmış Eudragit S-100 üzerine kovalent bağlama metodunu kullanarak % 83 aktivite verimi ile immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon enzimin optimum pH'sını 9,5'ten 10,5'e yükseltirken optimum sıcaklığı ise 60 °C'den 70 °C'ye yükselmiştir. Ayrıca, immobilizasyon enzimin K_m değerini yükseltirken, V_{max} değerini düşürmüştür. Öte yandan, immobilize enzimin aktivitesi beş kullanım sonunda % 72'ye düşerken, optimum saklama koşullarında aktivitesinin yarılanma süresinin 770 gün olduğu tespit edilmiştir.

Diğer bir çalışmada (Ahmed ve ark., 2007), *Bacillus Licheniformis* ATCC 21415 alkaline proteaz, sodyum periyodat ile aktive edilmiş amilopektin üzerine kovalent bağlama metodu kullanılarak % 70,5 immobilizasyon ve % 78,3 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir. İmmobilizasyondan sonra enzimin optimum pH'sı 10,0'dan 10,5'e yükselirken, optimum sıcaklığı 70 °C'den 80 °C'ye yükselmiştir. Ayrıca, immobilizasyon enzimin K_m değerini yükseltirken, V_{max} değerini düşürmüştür. Diğer taraftan, immobilize enzimin aktivitesinin 60 °C'de 60 dakika sonra % 78,3'ünü korurken, 115 dakika sonra aktivitenin yarıya indiği de gösterilmiştir.

Dragomirescu ve ark. (2008)'nin yaptığı çalışmada, *Bacillus licheniformis* CMIT I.33 proteaz, silis jelleri ve seramik matris ile entrapment metodu kullanılarak immobilize edilmiştir, elde edilen immobilizasyon verimleri sırasıyla % 7,4 ve % 45,27 iken, aktivite verimleri % 47 ve % 39 olarak gerçekleşmiştir. İmmobilizasyon, enzimin optimum pH'sını 9'dan 8'e, optimum sıcaklığını ise 65 °C'den 55 °C'ye düşürmüştür.

Dragomirescu ve ark. (2012) *Bacillus licheniformis* B 40'tan elde edilen proteazın immobilizasyonunda, en yüksek immobilizasyon verimini (% 74,9) granular seramik üzerine adsorbsiyonunda elde etmişlerdir. Enzimin optimum pH'sı (7,0) ve sıcaklığı (55 °C) immobilizasyondan etkilenmemiştir. Ayrıca immobilize enzim aktivitesi, optimum saklama koşullarında 1 ay sonunda % 59,5'e ve 2 ay sonunda ise % 11,4'e düşmüştür.

Literatürdeki en yeni çalışmada (Nazari ve ark., 2016), *Bacillus licheniformis* proteaz (Subtilisin Carlsberg), 3-aminopropiltrioksolan ile modifiye edilmiş silis jelleri üzerine glutaraldehit ile aktifleştirdikten sonra kovalent bağlama metodu ile immobilize edilmiş ancak, elde edilen immobilizasyon ve aktivite verimleri verilmemiştir. İmmobilize enzimin optimum pH ve sıcaklığının sırasıyla 9,0 ve 50 °C olduğu belirtilmiştir. İmmobilize enzim aktivitesi, optimum saklama koşullarında 10 günde % 50'ye düştükten sonra % 50 aktivite otuzuncu güne kadar korunmuş ve daha sonra kademeli olarak azalıp kırk gün sonunda % 25'e düşmüştür.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

Bacillus licheniformis proteaz (Alkaline Protease L), Bio-Cat firmasından (Troy, Amerika Birleşik Devletleri), Eupergit CM ise Röhm firmasından (Darmstadt, Almanya) hediye olarak temin edilmiştir. UV-VIS Spektrometresi (UV-6300PC), VWR firmasından (Radnor, USA); pH metre (Hanna HI 2020 edge), Hanna Instruments Ltd. firmasından (Bedfordshire, İngiltere), manyetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Standard), Heidolph UK - Radleys firmasından (Shire Hill, İngiltere), saf su cihazı (Mini Pure 1, MDM-0170), MDM Co. Ltd. firmasından (Suwon-si, Güney Kore), hassas terazi (Shimadzu-ATX224), Shimadzu Corporation firmasından (Kyoto, Japonya), orbital çalkalamalı ısıtmalı inkübatör (Mipro-MCI), Protek Lab Grup Profesyonel Laboratuvar Çözümleri firmasından (Ankara, Türkiye), vakum pompası (Biobase, GM-0.50A), Biobase Biodustry Co., Ltd. firmasından (Shandong, Çin), elektroforez sistemi (Mini-Protean Tetra Cell), Bio-Rad Laboratories firmasından (Hercules, ABD) satın alındı. Bovine Serum Albumin, Sodyum Hidroksit, Sodyum Dihidrojen Fosfat, Hidro Klorik Asit, L-Tirozin, Folin & Ciocalteu's Reagent, Kazein ve Bradford Reagent ise Sigma-Aldrich firmasından (Taufkirchen, Germany) ve Sodyum Azid, Merck Millipore firmasından (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır. Yarım yağlı UHT inek sütü lokal marketlerden satın alınmıştır.

3.2. Metotlar

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.1. Protein miktarının tayini

Protein miktarının tayini, Bradford (1976) metoduna göre, 0,2-1,4 mg/mL aralığındaki derişimlerde hazırlanan Bovine Serum Albümin Standart çözeltilerinin çift ışık yollu UV spektrometresinde 595 nm dalga boyunda ölçülen absorbansları kullanılarak oluşturulan standart grafiğine ait doğru denklemine göre yapılmıştır.

3.2.1.2. Proteinlerin sodyum dodesil sülfat-poli akrilamid gel elektroforez kullanılarak görüntülenmesi

Proteinler on kat seyreltikten sonra, indirgeyici olmayan koşullar altında % 0,1 (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren poliakrilamid gel elektroforezi (PAGE) ile ayrılmıştır. Elektroforez deneyleri, dikey plakalarda jeller bulunan bir elektroforez cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her örnek için % 12 akrilamid çözücü jel üzerine 20 µL protein çözeltisi yüklenmiştir. Protein örnekleri, Laemmli (1970) tarafından tarif edildiği gibi, renk işaretçisi olarak bromofenol mavisi kullanılarak, elektroforez blokun anot ucundan 0.5 cm kadar 120 V / 20 mA'de yürütülmüştür (yaklaşık 3 saat). Farklı protein fraksiyonlarının molekül kütlesi, elektroforetik hareketlilikleri, bilinen molekül kütlelerine (8,5-13,5-18,0-28,0-40,0-57,0-70,0 kDA) sahip işaretçi proteinlerin hareketlilikleri ile karşılaştırılarak tahmin edilmiştir.

3.2.2. L-Tirozin tayini

L-Tirozin tayini, 25-1000 µg/mL derişim aralığında hazırlanan L-Tirozin standart çözeltilerinin çift ışık yollu UV spektrometresinde 274 nm'de ölçülen absorbanları kullanılarak oluşturulan L-Tirozin standart grafiğine ait doğru denklemine göre yapılmıştır.

3.2.3. Proteaz aktivitesinin tayini

Proteaz aktivitesi, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde 200'er µL (77,2 IU) serbest ve 0,286'şar g (83,1 IU) immobilize enzimlerin, 5'er mL 25 mM'lık fosfat tamponu (pH 7,5) ile hazırlanmış % 1 (w/v)'lik kazein çözeltileri ile 200 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 70 °C'de 1 saat süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda, karışımlardan alınan 400'er µL numuneler saf su ile 4'er mL'ye tamamlanıp kaynayan suda 10 dakika bekletilerek enzim inaktive edildikten sonra, oluşan L-Tirozinin UV spektrometresiyle 274 nm'de ölçülen absorbanları kullanılarak L-Tirozin derişimleri tayin edilmiştir. Proteaz aktivitesi, L-Tirozin derişimleri kullanılarak hesaplanmıştır. 1 IU *Bacillus licheniformis* proteaz aktivitesi, standart koşullarda (pH 7,5; sıcaklık 70 °C; süre 1 saat; ve çalkalama hızı 200 rpm), 5 mL % 1 (w/v)'lik kazein çözeltisinde 1 dakikada 1 µmol L-Tirozin oluşturan enzim miktarı (mg) olarak tanımlanmıştır.

3.2.4. İmmobilizasyon şartlarının optimizasyonu

İmmobilizasyonda kullanılan matris miktarı, immobilizasyon çözeltisinin pH'sı ve molaritesi ile immobilizasyon süresi immobilizasyon ve aktivite verimini etkilediğinden (Katchalski-Katzir ve Kraemer, 2000), bu faktörlerden her birinin etkisi sırayla incelenerek immobilizasyon koşulları optimize edilmiştir.

3.2.4.1. Matris miktarının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

İmmobilizasyon, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerdeki 5'er mL 0,5 M'lık dört ayrı fosfat tampon çözeltilerine (pH 7,5) sırasıyla 100, 200, 300 ve 400 mg Eupergit CM ve 200'er µL (77,2 IU) enzim ilave edilerek, 25 °C'de 200 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 12 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

İmmobilizasyon sonunda, immobilize enzimler, por büyüklüğü 2 olan sinterli cam süzgeçler kullanılarak vakum altında süzülerek 3 defa 5'er mL 0,1 M'lık fosfat tamponu ile ve 3 defa da 5'er mL saf su ile yıkandıktan sonra immobilizasyon tamponunda ve süzüntülerde UV spektrometresi ile 595 nm'de absorbanslar ölçülerek protein miktarı hesaplanmış ve protein miktarları kullanılarak Denklem (3.1)'e göre immobilizasyon verimleri hesaplanmıştır.

Standart aktivite tayin metoduna göre tayin edilen serbest ve immobilize enzimlerin bağıl aktiviteleri kullanılarak da Denklem (3.2)'ye göre aktivite verimleri hesaplanmıştır.

$$\text{İmmobilizasyon verimi (\%)} = \frac{(\text{İmmobilizasyon tamponundaki protein} - \text{Süzüntüdeki protein})}{\text{İmmobilizasyon tamponundaki protein}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Aktivite verimi (\%)} = \frac{\text{İmmobilize enzimin aktivitesi}}{\text{Svı enzimin aktivitesi}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.4.2. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

İmmobilizasyon, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerdeki pH'ları farklı (5,0-6,0-7,0-7,5-8,0-9,0-10,0) olan 5'er mL fosfat tamponu çözeltilerine 100'er mg Eupergit CM ve 200'er µL (77,2 IU) serbest enzim ilave ederek 25 °C'de 200 rpm hızla

çalkalanan inkübatörde 12 saat süreyle gerçekleştirildikten sonra immobilizasyon ve aktivite verimleri hesaplanmıştır.

3.2.4.3. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

İmmobilizasyon, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerdeki derişimleri farklı (0,5-1,0-1,5-2,0 M) 5'er mL fosfat tamponu çözeltilerine (pH 7,5) 100'er mg Eupergit CM ve 200'er µL (77,2 IU) sıvı enzim ilave ederek 25 °C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde, 12 saat süreyle gerçekleştirildikten sonra immobilizasyon ve aktivite verimleri hesaplanmıştır.

3.2.4.4. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

İmmobilizasyon, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerdeki 5'er mL fosfat tamponu çözeltilerine (pH 7,5) 100'er mg Eupergit CM ve 200'er µL (77,2 IU) sıvı enzim ilave edilerek 25 °C sıcaklıkta 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde, farklı sürelerde (24-48-72-96-120 saat) gerçekleştirildikten sonra immobilizasyon ve aktivite verimleri hesaplanmıştır.

3.2.5. Serbest ve immobilize *Bacillus licheniformis* proteazların karakterizasyonu

3.2.5.1. Optimum pH

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde 200'er µL (77,2 IU) serbest ve 0,286'şar g (83,1 IU) immobilize enzimlerin 5'er mL 25 mM'lık farklı pH'lardaki (6,0-6,5-7,0-7,5-8,0-9,0-10,0-11,0-12,0) fosfat tamponu ile hazırlanmış % 1 (w/v)'lik kazein çözeltileri ile 200 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 70 °C'de 1 saat süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda tayin edildi. Optimum pH aralığı, Bağıl aktivite (%) - pH grafiğinden belirlenmiştir.

3.2.5.2. Optimum sıcaklık

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde 200'er µL (77,2 IU) serbest ve 0,286'şar g (83,1 IU) immobilize enzimlerin 25mM fosfat tamponu (pH 7,5) ile hazırlanmış 5'er mL % 1 (w/v)'lik kazein çözeltileri ile 200 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde farklı sıcaklıklarda (20-30-40-50-60-70-80-90

°C) 1 saat süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda bağıl aktiviteler tayin edilerek, Bağıl aktivite (%) - Sıcaklık (°C) grafiğinden optimum sıcaklık aralığı belirlenmiştir.

3.2.5.3. pH kararlılığı

200'er µL (77,2 IU) serbest ve 0,286'şar g (83,1 IU) immobilize *Bacillus licheniformis* proteazlar 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde, pH'ları farklı (5,0-6,0-6,5-7,0-7,5-8,0-9,0-10,0-11,0-12,0) olan 2,5'er mL 25 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerinde, 200 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında (25 °C), 1 saat süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 25 mM'lık fosfat tamponu (pH 7,5) ile hazırlanmış 2,5'er mL % 2 (w/v)'lik kazein çözeltileri eklenerek 70 °C'de, 1 saat süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda, bağıl aktiviteler tayin edilerek, sıvı ve immobilize enzimin kararlı olduğu pH aralığı belirlenmiştir.

3.2.5.4. Isıl kararlılık

200'er µL serbest (77,2 IU) ve 0,286'şar g (83,1 IU) immobilize *Bacillus licheniformis* proteazlar, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde pH'ları 7,5 olan 2,5'şer ml 25 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerinde, 200 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde farklı sıcaklıklarda (20-30-40-50-60-70-80-90 °C) 1 saat süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 25 mM'lık fosfat tamponu (pH 7,5) ile hazırlanmış 2,5'er mL % 2 (w/v)'lik kazein çözeltileri eklenerek 70 °C'de 1 saat süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda bağıl aktiviteler tayin edilerek, sıvı ve immobilize enzimin kararlı olduğu sıcaklık (°C) aralığı belirlenmiştir.

3.2.5.5. Kinetik sabitler

200'er µL serbest (77,2 IU) ve 0,286'şar g (83,1 IU) immobilize *Bacillus licheniformis* proteazların başlangıç aktiviteleri, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde, pH'sı 7,5 olan 25 mM'lık fosfat tamponu ile hazırlanmış farklı derişimlerdeki (5-10-15-20-25 g/L) 5'er mL kazein çözeltileri ile 200 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 15 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda başlangıç hızları tayin edilerek, çizilen Lineweaver-Burk Grafiğine ait doğru denkleminde V_{max} ve K_m sabitleri hesaplanmıştır.

3.2.5.6. Kullanım kararlılığı

İmmobilize enzimin kullanım kararlılığı, standart koşullarda tekrarlanan 20 kez kullanımı sonunda tayin edilen bağıl aktiviteleri kullanılarak çizilen grafik ile belirlenmiştir. İmmobilize enzim her kullanımdan sonra por büyüklüğü 2 olan sinterli cam süzgeç kullanılarak vakum altında bol miktarda saf su ile yıkanmıştır.

3.2.5.7. Saklama kararlılığı

İmmobilize enzimin saklama kararlılığı, 20 gün boyunca iki günde bir, standart metoda göre tayin edilen bağıl aktiviteleri kullanılarak çizilen grafik ile belirlendi. İmmobilize enzim, her kullanımdan sonra bol miktarda saf su ile yıkanarak 5 mL 0,1 M'lık fosfat tamponu çözeltisi içerisinde buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.6. Süt proteinlerinin hidrolizi

0,286 g (83,1 IU) immobilize *Bacillus licheniformis* proteazın 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişede 5 mL homojenize yarım yağlı UHT inek sütü ile 2 saatlik reaksiyonları süresince protein derişimindeki değişim, 30 dakika aralıklarla alınan örneklerde tayin edilen protein derişimlerinin zamana karşı çizilen grafiği ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

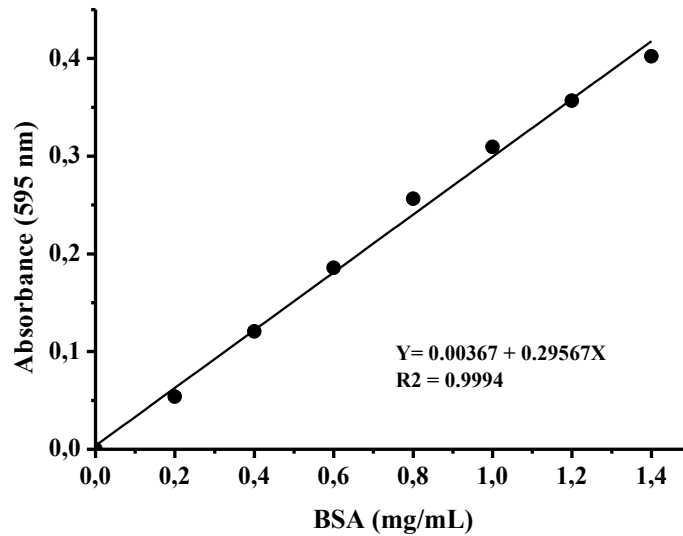
4.1. Protein Tayini

4.1.1. Protein miktarının tayini

Bradford (1976) metoduna göre elde edilen BSA standart grafiği Şekil 4.1'de görülmektedir. Grafikten elde edilen doğru denklemine (Denklem 4.1) ait belirleme katsayısı (R^2) 0.99427'dir.

$$Y = 0.00367 + 0.29567X \quad (4.1)$$

Denklem (4.1) kullanılarak, immobilizasyon çözeltisinde, immobilizasyon süzüntüsünde ve yarım yağlı UHT inek sütündeki proteinlerinin miktarları hesaplanmıştır. Buna göre, 200 μ L (77,2 IU) serbest *Bacillus licheniformis* proteaz içeren 5,2 mL immobilizasyon çözeltisindeki enzim derişimi 1,87 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Sıvı *Bacillus licheniformis* proteaz preparasyonundaki enzim derişimi de, immobilizasyon çözeltisindeki protein miktarının dilüsyon faktörünün (26) ile çarpılmasıyla, 48,6 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, yarım yağlı UHT inek sütündeki protein miktarı da 3,1 % olarak hesaplanmıştır.

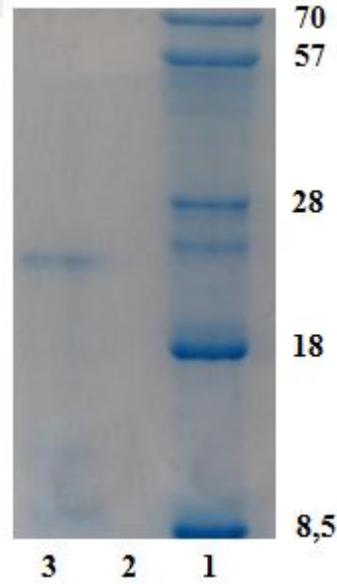


Şekil 4.1. BSA standart grafiği

4.1.2. Proteinlerin sodyum dodesil sülfat-poli akrilamid gel elektroforez kullanılarak görüntülenmesi

Şekil 4.2 dikkatle incelendiğinde, immobilizasyon çözeltisinde (3) yaklaşık 27 kDA civarında bir protein bandı açıkça görülmektedir. Ancak immobilizasyon süzüntüsünde (1 nolu hat) bu seviyede herhangi bir bant bulunmamaktadır. Bütün alkalın proteazların moleköl ağırlıkları ortalama 27 kDA olduğundan (Sellami-Kamoun ve ark., 2008), immobilizasyon koşullarının optimizasyonu sonucunda % 100 immobilizasyon veriminin elde edildiği anlaşılmaktadır.

Şekil 4.2'de ayrıca, işlenmemiş süt örneğinde bulunan proteinlerin (5 nolu hat) yaklaşık 27 kDA seviyesinde belirgin iki, yaklaşık 14 kDA seviyelerinde ise belli belirsiz bantlar oluşturdukları görülmektedir. Sütteki kazein fraksiyonları yaklaşık 19-29 kDA, laktoglobulin fraksiyonları ise 14 ve 19 kDA seviyelerinde bant oluşturmaktadır (Wróblewska ve Kaliszewska, 2012). İmmobilize proteaz ile hidroliz edilmiş süt örneğinde (2 nolu hat) bu bantların görünmemesi, hidrolizin % 100 oranında gerçekleştiği anlaşılmaktadır.



Şekil 4.2. İmmobilizasyon öncesi ve sonrası enzimin SDS-PAGE elektroforez görüntüsü.

- (1) İşaretçi proteinler (moleköl kütleleri birimi kDA'dur),
- (2) İmmobilizasyon süzüntüsü,
- (3) İmmobilizasyon çözeltisi,

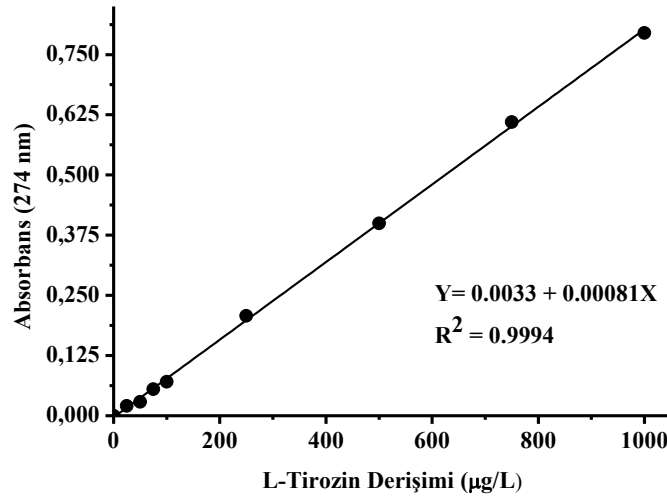
4.2. Enzim Aktivitesinin Tayini

L-Tirozin standart grafiği Şekil 4.3'de görülmektedir. Grafikten elde edilen doğru denkleminin (Denklem 4.2) belirleme katsayısı (R^2) 0.9994'tür.

$$Y = 0.0033 + 0.00081X \quad (4.2)$$

Denklem (4.2) kullanılarak, optimum aktivite tayin koşullarında, 200 μ L serbest *Bacillus licheniformis* proteaz ile kazeinin reaksiyonu sonucunda oluşan L-Tirozin miktarı 4370,4 μ g olarak hesaplanmıştır. 1 mL Serbest *Bacillus licheniformis* proteazın standart koŐullardaki aktivitesi de, Denklem (4.3) kullanılarak 386 IU/mL olarak hesaplanmıştır. 1 mL *Bacillus licheniformis* proteaz czltisi içerisinde 48,6 mg enzim bulunduğundan, *Bacillus licheniformis* proteazın spesifik aktivitesi 7,94 IU/mg proteaz olarak hesaplanmıştır. 1 IU aktiviteye sahip proteaz miktarı ise, 0,126 mg olarak hesaplanmıştır.

$$\text{IU/mL enzim} = \frac{\text{oluşan L-Tirozin } (\mu\text{mol})}{\text{kullanılan enzim hacmi (mL)} \times \text{Reaksiyon süresi (dk)}} \quad (4.3)$$



Şekil 4.3. L-Tirozin standart grafiği

4.3. İmmobilizasyon Şartlarının Optimizasyonu

4.3.1. Matris miktarının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

Enzimlerin kovalent immobilizasyonu, enzim moleküllerinin yapısını oluşturan amino asitlerin yan zincirlerinde bulunan amino (-NH₂), hidroksil (-OH) ve sülfidril (-SH) grupları ile Eupergit CM üzerinde yer alan epoksi gruplarının reaksiyonu ile gerçekleşmektedir. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi, en düşük immobilizasyon verimi 100 mg Eupergit CM kullanıldığında elde edilmiştir ve kullanılan matris miktarına bağlı olarak immobilizasyon verimi de artmaktadır. Bunun nedeni, matris miktarı arttıkça, matris üzerindeki epoksi gruplarının da artmasıdır. Öte yandan, en yüksek aktivite verimi de 100 mg Eupergit CM kullanıldığında elde edilmiştir. Yani, en yüksek immobilizasyon etkinliği, yani birim kütledeki immobilize enzimden elde edilen en yüksek aktivite 100 mg Eupergit CM ile elde edilmiş olmaktadır. Tablo 4.1'de dikkat çeken diğer bir sonuç da, artan Eupergit CM miktarına karşın aktivite veriminin azalmasıdır. Bunun nedeni, matris miktarı artırıldığında, enzim moleküllerinin matrise çoklu noktalardan bağlanması sonucu, enzim moleküllerinin optimum aktivite için zorunlu olan üç boyutlu yapısının bozulmasıdır. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, bundan sonraki immobilizasyon basamaklarında 100 mg Eupergit CM kullanılmasının daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

4.3.2. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

Tablo 4.2 incelendiğinde, immobilizasyon veriminin artan pH'ya karşılık azalarak pH 7,5'ten düşük değere indiği ve sonra tekrar arttığı görülmektedir. Buna karşılık tam tersine, artan pH'ya karşılık aktivite verimin artarak pH 7,5'te en yüksek değere çıkıp daha sonra tekrar azaldığı görülmektedir. Ayrıca, en düşük immobilizasyon ve en yüksek aktivite verimi pH'sı 7,5 olan tamponda elde edildiğinden, yani en yüksek immobilizasyon etkinliği pH 7,5'te elde edildiğinden, daha sonraki immobilizasyon basamaklarında en uygun pH'nın 7,5 olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar literatürde yer alan bilgilerle de örtüşmektedir. Çünkü, Eupergit C ile enzim immobilizasyonunda, en yüksek aktivite verimi genellikle enzimin optimum pH aralığında elde edilmektedir (Katchalski-Katzir ve Kraemer, 2000). Eupergit CM de Eupergit C ile aynı kimyasal

Tablo 4.1. Eupergit CM miktarının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

Eupergit (mg)	İmmobilizasyon Verimi (%)	Aktivite verimi (%)
100	21,0	98,2
200	24,4	96,9
300	27,4	96,1
400	35,1	95,6

Tablo 4.2. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

İmmobilizasyon tamponu pH'sı	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)
5,0	31,6	95,3
6,0	25,0	96,6
7,0	22,6	97,3
7,5	21,0	98,2
8,0	32,5	97,1
9,0	37,9	94,5
10,0	44,9	91,8

yapıya sahip olup, aralarındaki farklar taneciklerin ve gözeneklerin çapı ile üzerlerinde bulunan epoksi gruplarının miktarından kaynaklanmaktadır.

4.3.3. İmmobilizasyon tamponu molaritesinin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

Tablo 4.3'e bakıldığında, en düşük immobilizasyon veriminin 0,5 M'lık tampon kullanıldığında elde edildiği ve immobilizasyon için kullanılan tampon çözeltisinin derişimi arttıkça immobilizasyon veriminin arttığı görülmektedir. Bunun nedeni, artan derişime bağlı olarak alkalın pH'ya sahip tampondaki hidroksil gruplarının derişiminin artmasıyla enzim molekülündeki amino asitlerin yan zincirlerinde bulunan ve immobilizasyonda kovalent bağlanmayı sağlayan amino (-NH₂) gruplarının daha yüksek oranda (-NH₂) formuna geçmesidir. Çünkü Eupergit CM üzerindeki epoksi grupları, enzim molekülündeki amino grupları ile -NH₂ formunda reaksiyon vermektedir. Tablo 4.3'e göre, en yüksek aktivite veriminin de 0,5 M'lık tampon kullanıldığında elde edildiği ve immobilizasyon için kullanılan tampon çözeltisinin derişimi artmasıyla aktivite veriminin düştüğü de görülmektedir. İmmobilizasyon verimi artarken aktivite veriminin düşmesinin nedeni, bağlanan enzim miktarı artmasına rağmen, tampondaki iyon derişimlerinin artması, enzim moleküllerinin yapısında yer alan glutamat ve aspartat amino asitlerinin yan zincirlerinde bulunan karboksil (-COOH/-COO-) gruplarının yüksüz formdan yüklü forma geçmelerine neden

Tablo 4.3. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

Tampon Derişimi (M)	İmmobilizasyon Verimi (%)	Aktivite verimi (%)
0,5	21,0	98,2
1,0	31,5	96,0
1,5	36,6	95,4
2,0	42,4	94,6

olduğundan, enzim moleküllerinin üç boyutlu yapılarından sorumlu bağlanma türlerinden biri olan iyonik bağın zayıflaması sonucu optimum aktivite için zorunlu olan üç boyutlu yapının bozulmasından kaynaklanmaktadır (Katchalski-Katzir ve Kramer, 2000). Bu sonuçlara göre optimum tampon derişiminin 0,5 M olduğu anlaşıldığından, bundan sonraki immobilizasyon basamaklarında 0,5 M'lık tampon kullanılmıştır.

4.3.4. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

Tablo 4.4'e göre, denenen tüm sürelerde immobilizasyon veriminin % 100 olduğu ve en yüksek aktivite veriminin 24 saatlik immobilizasyonda elde edildiği, ayrıca süre attıkça aktivite veriminin azaldığı görülmektedir. Bunun nedeni genellikle, immobilizasyondan sonra matris üzerindeki boşta kalan epoksi gruplarının enzim moleküllerini matrise çoklu noktalardan bağlaması sonucu üç boyutlu yapının bozulmasıdır. Bu nedenle, *Bacillus licheniformis* proteazın Eupergit CM ile immobilizasyon çalışmalarında 24 saatlik sürenin optimum süre olduğu anlaşılmıştır.

İmmobilizasyon ve aktivite verimlerine etki eden faktörlerin optimizasyonu sonucunda, % 100 immobilizasyon ve % 107,7 aktivite verimi elde edilmiştir. Bu sonuçlar, *Bacillus licheniformis* proteazın immobilizasyonu ile ilgili literatürde yer alan çalışmalarda elde edilenler arasında en iyi olduğu gözlenmiştir.

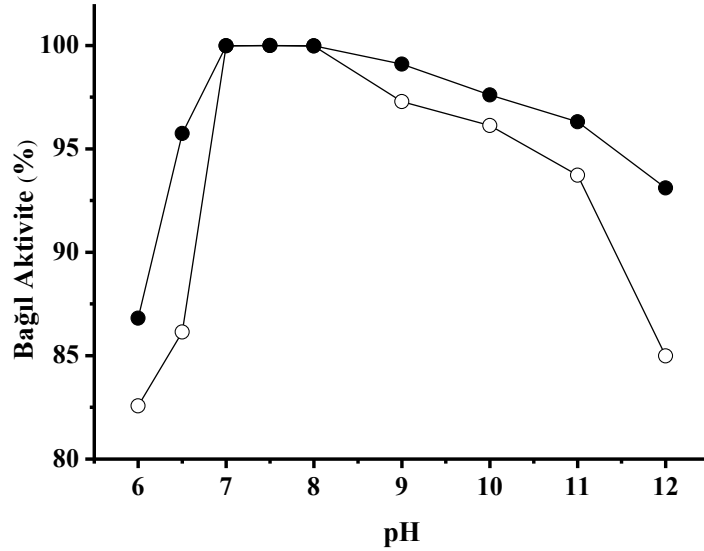
Tablo 4.4. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon ve aktivite verimlerine etkisi

İmmobilizasyon Süresi (Saat)	İmmobilizasyon Verimi (%)	Aktivite Verimi (%)
24	100,0	107,7
48	100,0	102,1
72	100,0	97,3
96	100,0	94,4
120	100,0	92,7

4.4. Sıvı ve İmmobilize *Bacillus licheniformis* Proteazların Karakterizasyonu

4.4.1. Optimum pH

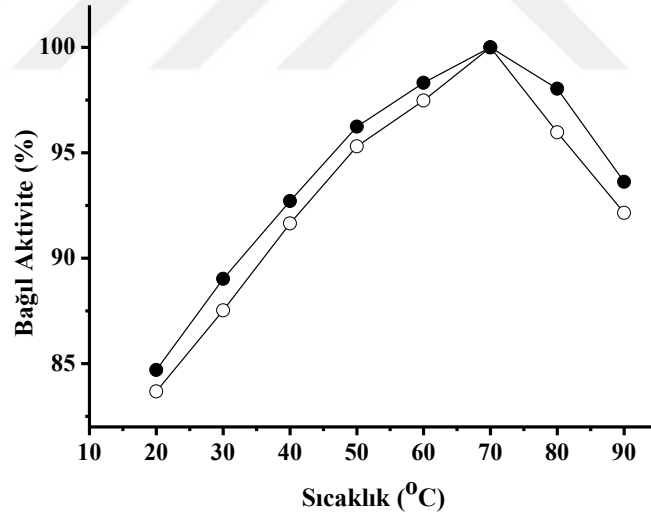
Şekil 4.4'e göre, *Bacillus licheniformis* proteazın optimum pH aralığı (7,0-8,0) immobilizasyondan etkilenmemiştir. Elde edilen bu sonuç, *Bacillus licheniformis* proteazın immobilizasyonu ile ilgili literatürde yer alan bazı çalışmalarındaki bulgularla kısmen örtüşmektedir. Ferreira ve ark. (2003), 3-aminopropiltrioksilan ile silanlaştırılmış ve glutaraldehit ile aktifleştirilmiş silika üzerine immobilize *Bacillus licheniformis* proteaz (Subtilisin Carlsberg)'ın optimum pH'sının 8,0 olduğunu bildirmişlerdir. *Bacillus licheniformis* CMIT 1.33 proteazın silis jelleri ve seramik matris ile entrapment metodu kullanılarak immobilizasyonunda optimum pH, 9,0'dan 8,0'a düşmüştür (Dragomirescu ve ark., 2008). *Bacillus licheniformis* B 40'tan elde edilen proteazın granular seramik üzerine adsorbsiyonunda, enzimin optimum pH'sı (7,0) değişmemiştir (Dragomirescu ve ark., 2012). Şekil 4.4'te dikkat çeken diğer bir sonuç ise, immobilize *Bacillus licheniformis* proteazın denenen bütün pH aralığında suda çözülmüş *Bacillus licheniformis* proteazdan daha yüksek aktivite gösterdiğiidir.



Şekil 4.4. Serbest (○) ve immobilize (●) *Bacillus licheniformis* proteazın optimum pH'sı

4.4.2. Optimum sıcaklık

Şekil 4.5 incelendiğinde, optimum sıcaklığın (70 °C) immobilizasyondan etkilenmediği görülmektedir. Silva ve ark. (2006) da, *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen alkalın proteaz Esperazın karbodiimid ile kaplanmış Eudragit S-100 üzerine kovalent bağlama ile immobilizasyonunda, optimum sıcaklığının 60 °C'den 70 °C'ye yükseldiğini etmişlerdir. Diğer bir çalışmada (Ahmed ve ark., 2007), *Bacillus Licheniformis* ATCC 21415 alkalın proteaz, sodyum periyodat ile aktive edilmiş amilopektin üzerine kovalent bağlama ile immobilizasyonunda, optimum sıcaklık 70 °C'den 80 °C'ye yükselmiştir. Şekil 4.5'e göre ayrıca, immobilize enzimin denenen bütün sıcaklık aralığında serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterdiği açıkça görülmektedir. Genellikle, immobilizasyon enzimin ısı kararlılığını artırdığından yüksek sıcaklıklarda immobilize enzimler serbest enzimlere göre yüksek aktivite gösterirler.



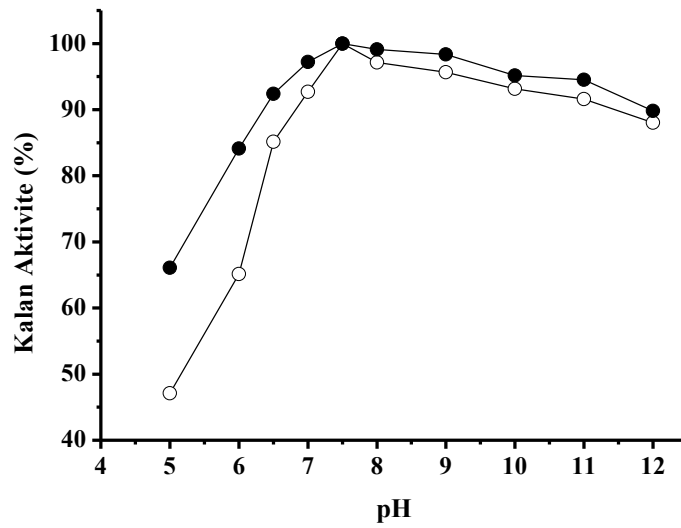
Şekil 4.5. Serbest (○) ve immobilize (●) *Bacillus licheniformis* proteazın optimum sıcaklığı

4.4.3. pH kararlılığı

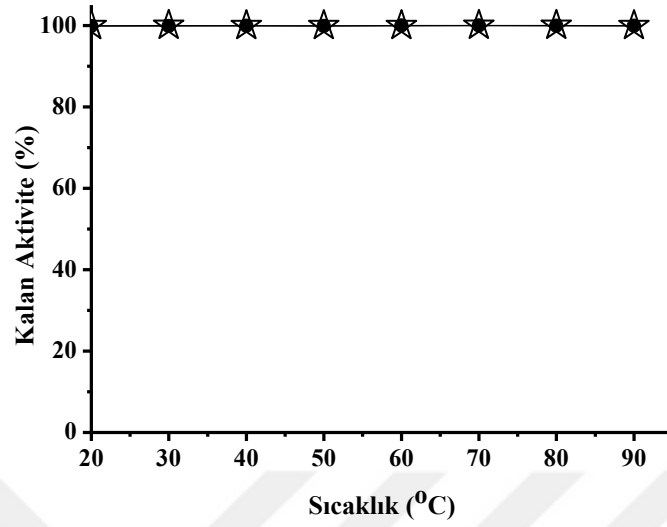
Şekil 4.6'da, serbest ve immobilize enzimin alkalın pH'larda, asidik pH'lardakine göre çok daha yüksek olduğu görülmektedir. *Bacillus licheniformis* alkalın proteazın aktif bölgesinde katalitik rol alan aspartik asidin karboksil grubu ve histidinin ϵ -amino grubu kataliz sırasında alkalın pH aralığında daha çok protonsız haldedirler. Muhtemelen, bu grupların asidik pH aralığında protonlanmış halde olması aktivitenin düşük olmasına yol açmaktadır. Şekil 4.6'ya göre ayrıca, denenen bütün pH değerlerinde immobilize enzimin serbest enzimden daha kararlı olduğu görülmektedir. Bu da, muhtemelen enzim moleküllerinin matrise en güçlü kimyasal bağ olan kovalent bağ ile bağlanmasının enzimin üç boyutlu yapısını kuvvetlendirmesinden kaynaklanmaktadır.

4.4.4. Isıl kararlılık

Şekil 4.7 sıcaklığın serbest ve immobilize enzimin kararlılığına etkisini göstermektedir. Şekilde, serbest ve immobilize enzim denenen bütün sıcaklıklarda, kararlılığını büyük ölçüde koruduğu açıkça görülmektedir. Genellikle immobilizasyonun enzimlerin ısıl kararlılığını artırdığı bilinmektedir. Ayrıca, *Bacillus licheniformis*'in termofil karakteri de buna katkı sağlamış olabilir.



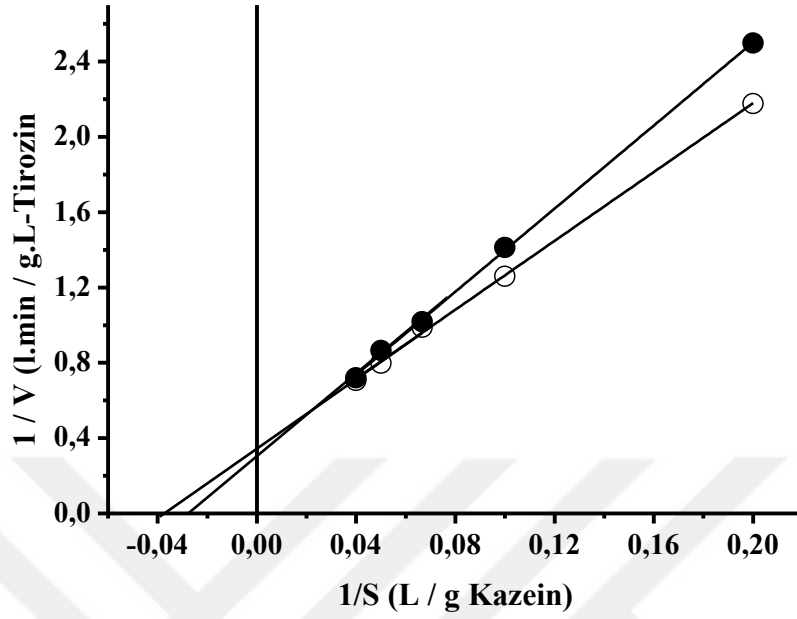
Şekil 4.6. Serbest (○) ve immobilize (●) *Bacillus licheniformis* proteazın pH kararlılığı



Şekil 4.7. Serbest (☆) ve immobilize (●) *Bacillus licheniformis* proteazın ısıl kararlılığı

4.4.5. Kinetik sabitler

Serbest ve immobilize enzimin Michaelis-Menten (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) sabitleri Lineweaver-Burk Grafiği (Şekil 4.8) kullanılarak hesaplandı. İmmobilizasyon, K_m sabitinin değerini 0,0387 g/L'den 0,0269 g/L'ye düşürürken, V_{max} değerini 2,95 g/L.dk'dan 3,38 g/L.dk'ya yükseltmiştir. K_m değeri, bir enzimin substrata olan ilgisini göstermektedir. K_m küçüldükçe enzimin substrata olan ilgisi artar. İmmobilize *Bacillus licheniformis* proteazın K_m değerinin serbest enziminkinden küçük, V_{max} değerinin ise büyük olması, immobilize enzimin serbest enzimden % 7,7 daha yüksek aktiviteye sahip olması ile birbirini desteklemektedir. Benzer sonuçlara literatürde de rastlanmaktadır. Örneğin, *Bacillus licheniformis* proteazın (Subtilisin Carlsberg), 3-aminopropiltrioksolan ile silanlaştırılan ve glutaraldehit ile aktifleştirilen silis jelleri üzerine kovalent bağlama metodu ile immobilizasyonunda da immobilizasyon enzimin K_m değerini azaltmıştır (Nazari ve ark., 2016).



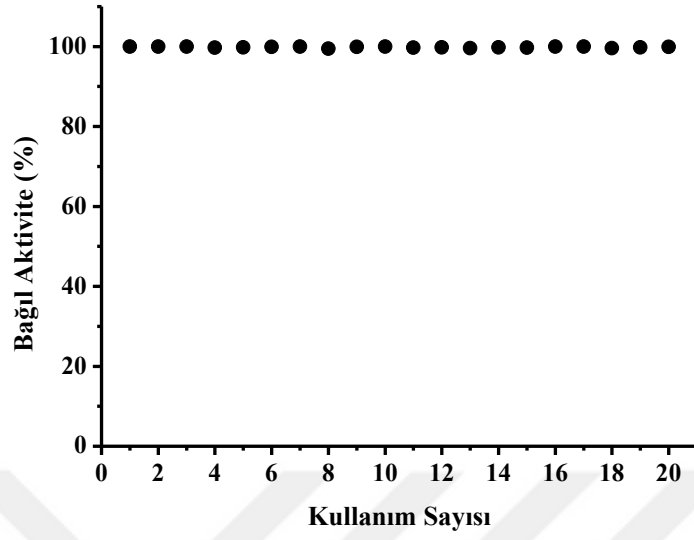
Şekil 4.8: Serbest (○) ve immobilize (●) *Bacillus licheniformis* proteazın Lineweaver Burk Grafiği

4.4.6. Kullanım kararlılığı

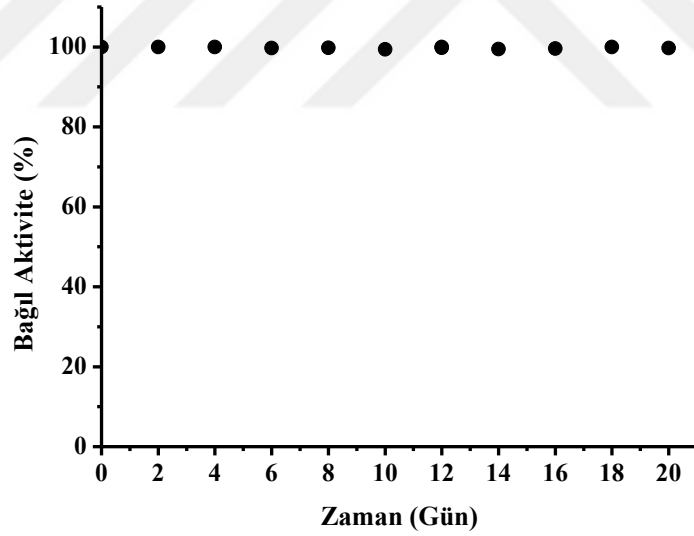
Şekil 4.9'da görüldüğü gibi, immobilize enzim kesikli üretim prosesinde optimum koşullarda tekrarlanan yirmi kullanım süresince aktivitesini kaybetmemiştir.

4.4.7. Saklama kararlılığı

Şekil 4.10'a göre, immobilize enzim kesikli üretim prosesinde optimum saklama koşullarında yirmi gün boyunca aktivitesini kaybetmemiştir.



Şekil 4.9. İmmobilize *Bacillus licheniformis* proteazın kullanım kararlılığı

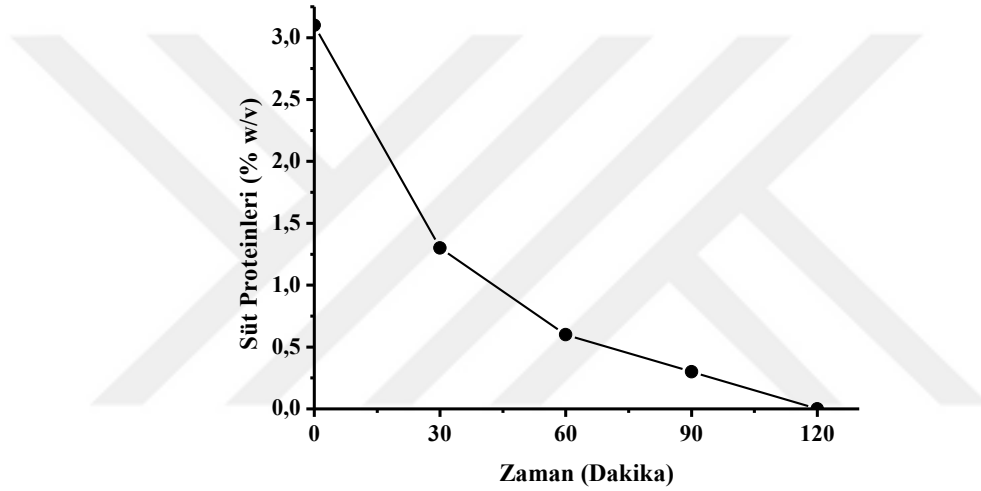


Şekil 4.10. İmmobilize *Bacillus licheniformis* proteazın saklama kararlılığı

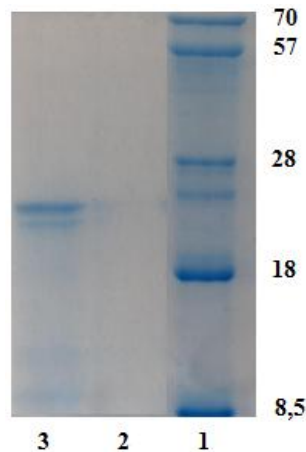
4.4.8. Süt proteinlerinin hidrolizi

Optimum aktivite koşullarında 0,286 g (83,1 IU) immobilize enzim ile 5 mL yarım yağlı UHT inek sütünün iki saat süreyle reaksiyonu sırasında 30 dakika aralıklarla alınan örneklerde protein tayini yapılarak zaman karşı protein derişimi grafiğı oluşturulmuştur (Şekil 4.11). Şekilde açıkça görüldüğü üzere başlangıçta %

(w/v) 3,1 olan protein derişimi 120 dakika sonunda tamamen hidrolize olmuştur. Bu sonuç, Şekil 4.12'deki veriler ile de açıkça desteklenmektedir. Bu sonuç literatürde elde edilen en yüksek hidroliz derecesidir. Hidrolizden önce süt proteinlerinin oluşturduğu elektroforez bandının hidroliz sonrasında oluşmadığı görülmektedir. Ayrıca hidroliz sonucunda sütteki pH değişimi de incelenmiştir. Hidroliz öncesinde 6,89 olan pH'nın, hidroliz sonunda 6,53'e düştüğü gözlenmiştir. Ayrıca, hidrolizden sonra süütün renginin biraz berraklaştığı da gözlenmiştir. Öte yandan, hidroliz sonunda süütün tadında ve kokusunda herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.



Şekil 4.11. İmmobilize *Bacillus licheniformis* proteaz kullanarak yarım yağlı UHT inek sütü proteinlerinin hidrolizi.



Şekil 4.12. Hidroliz öncesi ve sonrasında yarım yağlı UHT inek sütündeki proteinlerin SDS-PAGE elektroforez görüntüsü. (1) İşaretçi proteinler (molekül kütlesi birimi kDA'dur), (2) Proteinleri hidroliz edilmiş yarım yağlı UHT inek sütü, (3) Yarım yağlı UHT inek sütü.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bacillus licheniformis proteazı immobilizasyon koşullarını optimize ederek en yüksek immobilizasyon (% 100) ve aktivite (% 107.7) verimleri ile immobilize edilmiştir.

İmmobilizasyon, enzimin optimum pH aralığını (7,0-8,0) ve optimum sıcaklığı (70 °C) değiştirmemiştir.

İmmobilizasyon, K_m 'yi 0,0387 g kazein/ L'den 0,0269 g kazein / L'ye düşürürken ve V_{max} değerini 2.95 g L-Tirozin / L.dk'dan 3.38 g L-Tirozin / L.dk'ya yükseltmiştir.

İmmobilize enzim, optimum koşullarda yirmi kez tekrarlanan kullanım ve yirmi gün depolama periyodu boyunca (bir buzdolabında +4 °C'de 5 ml 0,1 M sodyum dihidrojen fosfat tamponunda) aktivitesini kaybetmemiştir.

Yarım yağlı UHT inek sütünde bulunan proteinler iki saat içinde tamamen hidrolize edilmiştir.

5.2. Öneriler

Öncelikle, bu tezde ulaşılan sonuçlar kamuoyuna duyurulabilir.

Ayrıca, *Bacillus licheniformis* proteaz için geliştirilen immobilizasyon metodu ve immobilize *Bacillus licheniformis* proteaz kullanarak protein alerjisine neden olmayan inek sütü üretimi için patent başvurusu yapılabilir.

Son olarak, ülkemizdeki büyük süt firmalarıyla görüşülerek, yeni doğanlar için, protein alerjisine neden olmayan inek sütünün endüstriyel üretiminin gerçekleştirilmesine çalışılabilir.



6. KAYNAKLAR

- Ahmed S.A., Saleh S.A. and Abdel-Fattah A.F., 2007. Stabilization of *Bacillus Licheniformis* ATCC 21415 Alkaline Protease by Immobilization and Modification. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.*, 1(3): 313-322.
- Anonim, 2014. The state of the world's children 2014 in numbers. <http://www.unicef.org/sowc2014/numbers>, "United Nations Children's Fund (UNICEF)"
- Anonim, 2016, <http://www.bebekvealerji.com/inek-sutu-alerjisi-olabilir-mi/inek-sutu-alerjisi-nedir/>, "Çocuk Alerji ve Astım Akad. Dern."
- Aslan Y., Tanrıseven A., 2007, Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce galactooligosaccharides., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, 45: 73-77.
- Aslan Y., Handayani N., Stavila E., Loos K., 2014, Covalent immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase onto Eupergit CM., *International Journal of Current Research.*, 6 (02): 5225- 5228.
- Behbahani P., Jayashankara M., Bhat G.S., 2013, Influence Of Caseinophosphopeptides On Performance Of Lactic Cultures in Fermented Milk, *Science Journal of Microbiology.*, 1-7
- Blandino A., Macias M., Cantero D., 2000, Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules., *Enzyme and Microbial Technology.* 27:319-24
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.*, 72: 248-254.
- Caffarelli C., Baldi F., Bendandi B., Calzone L., Marani M., Pasquinelli P., 2010, Cow's milk protein allergy in children: a practical guide., *Italian Journal of Pediatrics.*, 36:5.
- Chatchatee P., Järvinen K.M., Bardina L., Beyer K., and Sampson H.A. 2001. Identification of IgE and Ig G binding epitopes on alpha (s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy., *Journal of Allergy and Clinical Immunology.*, 107(2):379-383.
- Chui WK., Wan LSC., 1997, Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium Alginate microspheres., *Journal of Microencapsulation.*, 1997;14(1):51-61
- Coşkun H., Sienkiewicz T., 2009. Degradation of milk proteins by extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* flk-61., *Food Biotechnology.*, 13 (3): 67-275.
- Dragomirescu M., Preda G., Vintilă T., Vlad-Oros B., Bordean D., and Savii C., 2012. The effect of immobilization on activity and stability of a protease preparation obtained by an indigenous strain *Bacillus licheniformis* B 40., *Revue Roumaine de Chimie.*, 57(2): 77-84
- Dragomirescu M., Vintilă T., Vlad-Oros B., and Preda G., 2008. Stabilization of microbial enzymatic preparations used in feed industry., *Scientific Papers, Animal Science and Biotechnologies.*, 41 (1): 69-72
- Drevon GF., 2002, Enzyme immobilization into polymers and coatings., *Ph. D Thesis. University of Pittsburgh, U.S.*, 1-245
- Eigel W. N., Hofmann C. J., Chibbert B. A. K., Tomicht J. M., Keenan T. W. ve Mertz E. T., 1979, Plasmin-mediated proteolysis of casein in bovine milk., *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America.*, Vol. 76, No. 5, pp. 2244-2248
- Elfahri K., 2012, "Release Of Bioactive Peptides From Milk Proteins By *Lactobacillus* Species", A thesis submitted in completion of requirements of the degree of Master of Science, *School Of Biomedical And Health Sciences, Faculty of Health, Engineering And Science Victoria University Melbourne*, Victoria, 29-69.
- Ferreira L., Ramos M.A., Dordick J.S., and Gil M.H., 2003. Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg)., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, 21: 189-199.
- Fiocchi A., Schünemann H.J., Brozek J., Brozek J., Restani P., Beyer K., Troncone R., Martelli A., Terracciano L., Bahna S.L., Rancé F., Ebisawa M., Heine R.G., Assa'ad A., Sampson H., Verduci E., Bouygue G.R., Baena-Cagnani C., Canonica W., and Lockey R.F. 2010. Diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA): a summary report., *Journal of Allergy and Clinical Immunology.*, 126(6):1119-1128.
- Gupta R., Beg Q.K., and Lorenz P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications., *Applied Microbiology and Biotechnology.*, 59:15–32.
- Hayashi S. Sasao S, Takasaki Y., Mada K.,1994. Long-term continuous reaction of immobilized β -fructofuranosidase., *Biotechnology Letters.*, 16(3):227-8
- Kaminogawa S., Yamauchi K., 1972, Decomposition of β -Casein by Milk Protease Similarity of the Decomposed Products to Temperature-sensitive and R-Caseins., *Agricultural and Biological Chemistry.*, 36:2, 255-260.
- Kaminogawa S., Yamauchi K., Miyazawa S., and Koga Y., 1980. Degradation of Casein Components by Acid Protease of Bovine Milk., *Journal of Dairy Science.*, 63:701-704
- Katchalski-Katzir E., Kraemer D.M., 2000, Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, 10: 157–176
- Klibanov A.M. 1979. Enzyme stabilization by immobilization., *Analytical Biochemistry.*, 93:1–25.
- Koca T., Akçam M., 2015. İnek sütü protein alerjisi. *Dicle Tıp Dergisi.* 42 (2): 268-273.
- Kumar D., Thakur N., Verman R., Bhalla T.C. 2008. Microbial Proteases and Application as Laundry Detergent Additive., *Research Journal of Microbiology.*, 3(12):661-672.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4., *Nature.*, 227: 680–685.
- Mattiasson B., and Kaul, R., 1991. Determination of coupling yields and handling of labile proteins in immobilization technology., In: *Protein immobilization: Fundamentals and Applications* (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, NY, pp. 161–179.
- Messing R.A., 1976. Adsorption and inorganic bridge formations. In: *Methods in Enzymology*, volume XLIV, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, New York, NY, pp. 148–169.
- Nazari T., Alijanianzadeh M., Molaeirad A., and Khayati M., 2016. Immobilization of Subtilisin Carlsberg on modified silica gel by cross-linking and covalent binding methods., *Biomacromolecular Journal.*, 2(1): 53-58.

- O'Driscoll K.F., 1976. Techniques of enzyme entrapment in gels. In: Methods in Enzymology, Volume XLIV, (Mosbach K., ed.), Academic Press, New York, NY, pp. 169–183.
- Poulsen, P. B. and Buchholz, H. K. 2003. History of enzymology with emphasis on food production. In: Handbook of Food Enzymology, eds. Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J. and Wong, D. W. S. 1–20. Marcel Dekker, New York.
- Raghul Subin S. and Bhat S.G., 2016. Enzymes: Concepts, Nomenclature, Mechanism of Action and Kinetics, Characteristics and Sources of Food-Grade Enzymes. In: Enzymes in Food and Beverage Processing. eds. Chandrasekaran, M. Pages:3-38. CRC Press: Taylor & Francis Group. New York.
- Roehm, immobilization of enzymes on Eupergit[®]C and Eupergit[®]C 250 L. Product data sheet 05/95.
- Scouten W.H., 1987. A Survey of Enzyme Coupling Techniques. In: Methods in Enzymology, volume 135, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, London, pp. 30–65.
- Sellami-Kamoun A., Haddar A., El-Hadj Ali N., Ghorbel-Frikha B., Kanoun S., and Nasri M., 2008. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations., *Microbiological Research.*, 163: 299-306.
- Silva C.J.S.M., Zhang Q., Shen J., and Cavaco-Paulo A., 2006. Immobilization of proteases with a water soluble–insoluble reversible polymer for treatment of wool., *Enzyme and Microbial Technology.*, 39: 634–640.
- Smidsrod O., Skjak-Braek G., 1990, Alginate as immobilization matrix for cells., *Trends in Biotechnology.*, 8:71-77.
- Szélpál S., Fejes K., Csanádi J., Šoronja-Simović D., László S., Keszthelyiszabó G., Hodúr C., 2013, Enrichment of Bioactive Material By Enzymatic Degradation and Membrane Separation, *Annals of Faculty Engineering Hunedoara-International Journal of Engineering, Facicule*, 4, 1-6
- Tavaria F. K., Sousa M. J., Domingos A., Malcata F. X., Brodelius P., Clemente A., Pais M. S., 1997, Degradation of Caseins from Milk of Different Species by Extracts of *Centaurea calcitrapa*., *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 45 (10): 3760–3765
- Torres-Bacete J., Arroyo M., Torres-Guzman R., De la Mata I., Castillon PM., and Acebal C., 2000, Covalent immobilization of penicillin V acylase from *Streptomyces levandulea*., *Biotechnology Letters.*, 22: 1011-1014.
- Tosa T., Mori T., Fuse N., and Chibata I. 1966. Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water insoluble aminoacylase., *Enzymologia.*, 31: 214–224.
- Trujillo A. J., Guamis B., Carretero C., 1998. Hydrolysis of Bovine and Caprine Caseins by Rennet and Plasmin in Model Systems., *American Chemical Society.*, 46 (8), pp 3066–3072.
- Wal J.M., 1998. Cow's milk allergens., *Allergy.*, 53:1013-1022.
- Woodward J., 1985. Immobilized enzymes: adsorption and covalent coupling. In: Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach, (Woodward, J., ed.), IRL, Oxford, UK, pp. 3–17.
- Wróblewska B., and Kaliszewska A., 2012. Cow's Milk Proteins Immunoreactivity and Allergenicity in Processed Food. *Czech Journal of Food Sciences.* 30 (3): 211–219.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı Derya ÖMEROSMANOĞLU
Doğum Yeri ve Tarihi 07.04.1986 Gevaş / İST.-TÜRKİYE
Telefon +90 554 970 33 61
E-posta deryaomerosmanoglu@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: T.E.B. Ataşehir Lisesi	2003
Üniversite	: Yüzüncü Yıl Üniversitesi	2010
Üniversite	Anadolu Üniversitesi (İşletme)	2014
Üniversite	Anadolu Üniversitesi(Uluslararası İlişkiler)	Devam
Yüksek Lisans	: Siirt Üniversitesi	2016

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2012-Devam	Kalite Gıda San. Ve Tic. A.Ş.	Kalite-Kontrol Ve Güvence Müdürü Ve İhracat Müdürü
2011-Devam	CICert Belgelendirme Hizmetleri	Baş Denetçi ve Denetim Uzmanı
2014-2015	Bereket Yemek	Yönetici Danışmanlığı Ve Kalite Denetimi
2014-2016	Fan Fang Çin Mutfağı	Yönetici Danışmanlığı Ve Kalite Denetimi
2014-Devam	Ercanlar Krem Şanti	Yönetici Danışmanlığı Ve Kalite Denetimi

2013-2015	Proaktif İSG Eğitim, Danışmanlığı	İSG Uzmanı Ve Organizasyon Sorumlusu Yönetici Danışmanlığı Ve Kalite Denetimi
2013-2014	Fırın Safranbolu	Türkiye Ofisi Genel Müdürü
2013-2014	Pacific Australia	Kalite Kontrol Ve Güvence Müdürü
2011	Atomizer Kozmetik	Kalite Denetçisi
2011	Temaş Catering	

UZMANLIK ALANI: Kalite Yönetim Sistemleri, İSG, İmalat, Ürün Tasarım, İhracat

YABANCI DİLLER: İngilizce, Farsça

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

**ULUSAL VE ULUSLARARASI KONGRE VE SEMPOZYUMLARDA
SUNULAN BİLDİRİLER**

1. Aslan Y., **Ömerosmanoğlu D.** "Protein alerjisine neden olmayan inek sütü üretmek için *Bacillus licheniformis* proteazının immobilizasyonu", Biyoçeşitlilik ve Yenilebilir Vahşi Türler Uluslararası Sempozyumu, 3-5 Nisan 2017, Antalya (Sözlü Bildiri).

PROJELER

1. Aslan Y. (Proje Yürütücüsü), **Ömerosmanoğlu D.** (Yardımcı Araştırmacı), *Bacillus licheniformis* Proteazın İmmobilizasyonu ve Alerjik Olmayan İnek Sütü Üretiminde Kullanımı, 2016, BAP Projesi. Proje No:2016-SİÜFEB-03. (Devam ediyor.) Bütçe: 5.900,00 TL.