



**FARKLI İNKÜBASYON KOŞULLARI VE STRES FAKTÖRLERİNİN  
MİKROBİYAL TRANSGLUTAMİNAZ ÜRETİMİNE ETKİSİ, ENZİMİN  
KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Gökhan DOMURCUK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Dr. Öğr. Üyesi Hilal İŞLEROĞLU**

**Temmuz - 2018  
Her hakkı saklıdır**

T.C.  
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI İNKÜBASYON KOŞULLARI VE STRES FAKTÖRLERİNİN  
MİKROBİYAL TRANSGLUTAMİNAZ ÜRETİMİNE ETKİSİ, ENZİMİN KISMİ  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Gökhan DOMURCUK

TOKAT  
Temmuz - 2018

Her hakkı saklıdır



**Bu tez çalışması;**

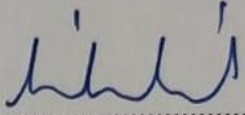
**TÜBİTAK-TOVAG (Proje no: 115O216) ve Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: 2016/59) tarafından maddi olarak desteklenmiştir.**

Gökhan DOMURCUK tarafından hazırlanan “Farklı İnkübasyon Koşulları ve Stres Faktörlerinin Mikrobiyal Transglutaminaz Üretimine Etkisi, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 9 TEMMUZ 2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

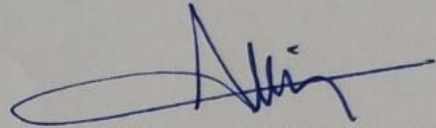
### İmza

Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Hilal İŞLEROĞLU  
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi



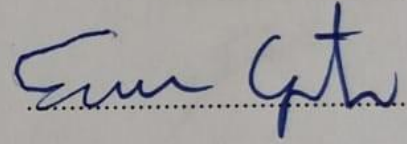
.....

Üye  
Doç. Dr. Şeniz KARABIYIKLI  
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi



.....

Üye  
Dr. Öğr. Üyesi Evren GÖLGE  
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi



.....

ONAY



.....

Prof. Dr. Ebubekir ALTUNTAŞ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

13-07/2018

## TEZ BEYANI

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.

**Gökhan DOMURCUK**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### FARKLI İNKÜBASYON KOŞULLARI VE STRES FAKTÖRLERİNİN MİKROBİYAL TRANSGLUTAMİNAZ ÜRETİMİNE ETKİSİ, ENZİMİN KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

GÖKHAN DOMURCUK

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ HİLAL İŞLEROĞLU)

Bu çalışmada, transglutaminaz (TG) enziminin farklı türlerden mikrobiyal olarak üretilmesi, fermantasyon koşullarının geliştirilmesi, enzim üretimine etki eden stres faktörlerinin belirlenmesi, enzimin farklı yöntemler ile kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. *Streptomyces mobaraensis* (NRRL B-3729) türü kullanılarak 30°C'de pH 6.0'da nişasta-glukoz bazlı besiyerinde (GNB) mikrobiyal transglutaminaz (mTG) enzim üretimi (0.036 Ünite/ml) başarılı bir şekilde sağlanmıştır. Aynı koşullarda çalkalamalı (orbital) inkübasyonda enzim aktivitesinde ~3.75 katlık bir artış sağlanmış ve ayrıca üretim süresi kısaltılmıştır. Ayrıca, daha etkin bir karıştırma ve havalandırmanın sağlandığı kontrollü fermantasyonda (500 rpm, 10 cm<sup>3</sup> hava/dak) 0.423 Ünite/ml değerinde aktiviteye ulaşılarak çalkalamalı inkübasyona göre enzim aktivitesinde 3.13 kat, statik inkübasyona göre ise 11.75 kat artış sağlanmıştır. Enzim üretimine stres faktörlerinin etkisi incelenmiş ve kullanılan tüm tuz çeşitleri ve tripsin enzimi aktivitede önemli bir artış sağlamıştır. Üretilen mTG enziminin kısmi saflaştırma basamağında, %80 amonyum sülfat tuz doyumluğunda gerçekleştirilen çöktürme işleminde verim %93 ve saflaştırma katsayısı 1.18, %80 etanol konsantrasyonunda ise verim %98 ve saflaştırma katsayısı 1.00 olarak belirlenmiştir. Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz işlemleri sonrasında elde edilen ~37 kDa moleküler ağırlığa sahip kısmi saflaştırılmış enzimin kinetik parametreleri belirlenerek Michaelis sabiti ( $K_m$ ) 6.35 mM, maksimum hızı ( $V_{max}$ ) 0.35 Ünite/ml olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı 37°C ve pH'sı 5.8 olarak belirlenirken, pH 6.0'da 55°C'de stabilitesini yüksek oranda koruduğu (~%93) gözlenmiştir. Bazı metal iyonları ( $Fe^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ) varlığında mTG enzimi aktivitesinde kayıplar meydana gelirken, EDTA bulunan reaksiyon ortamında aktivitede artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar farklı fermantasyon stratejilerinin kullanılarak mTG enzim üretiminde artış sağlanabileceğini göstermektedir ve saflaştırılan enzimin karakterizasyonunun bu tür enzimlerin endüstrideki uygulama alanlarında kullanılabilirlikleri açısından önem arz etmektedir.

2018, 128 sayfa

**ANAHTAR KELİMELER:** Mikrobiyal transglutaminaz, *Streptomyces mobaraensis*, saflaştırma, karakterizasyon, mikrobiyal stres faktörleri

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

#### EFFECT OF DIFFERENT INCUBATION CONDITIONS AND STRESS FACTORS ON MICROBIAL TRANSGLUTAMINASE PRODUCTION, PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF THE ENZYME

GÖKHAN DOMURCUK

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: ASST.PROF.DR. HİLAL İŞLEROĞLU)

In this study, microbial production of transglutaminase (TG) from different strains, development of fermentation conditions, determination of stress factors affecting enzyme production, partial purification by different methods and characterization of enzyme have been carried out. Microbial transglutaminase (mTG) production (0.036 Unit/ml) was achieved in starch-glucose based medium (GNB) at pH 6.0 and 30°C using *Streptomyces mobaraensis* (NRRL B-3729). At the same conditions, an increase of ~3.75 fold in enzyme activity was achieved with orbital incubation and the production period was shortened. In addition, an activity of 0.423 Unit/ml was obtained with a controlled fermentation (500 rpm, 10 cm<sup>3</sup> air/min) where more efficient mixing and aeration was provided, resulting in an increase of 3.13 and 11.75 fold in enzyme activity compared to orbital and static incubation, respectively. The effect of stress factors on enzyme production has been examined, and the salts and trypsin provided a significant increase in enzyme activity. In the partial purification step, the yield was 93% and the purification fold was 1.18 for the precipitation with 80% ammonium sulfate salt saturation, and the yield was 98% and the purification fold was 1.00 for the 80% ethanol concentration. Kinetic parameters of the partially purified enzyme obtained after ammonium sulfate precipitation and dialysis were determined and the Michaelis constant ( $K_m$ ) was calculated as 6.35 mM and the maximum velocity ( $V_{max}$ ) as 0.35 Unit/ml. While the optimum temperature of the enzyme was 37°C and pH 5.8, the stability was observed to be high (~ 93%) at 55°C and pH 6.0. There was a loss of mTG enzyme activity at the presence of certain metal ions ( $Fe^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ), and an increase was determined in EDTA. These results demonstrate that different fermentation strategies can be used to increase mTG production and characterization of purified enzymes is important in terms of their utility in industrial applications.

2018, 128 Pages

**KEY WORDS:** Microbial transglutaminase, *Streptomyces mobaraensis*, purification, characterization, microbial stress factors

## ÖNSÖZ

Bana lisansüstü eğitim imkanını sağlayan ve bu eğitimimde maddi ve manevi destek olan, bakış açımı genişleten ve olaylara çözüm üretme kabiliyetimi yükselten, kendi tecrübelerini esirgemeyen saygı değer danışmanım Dr.Öğr.Üyesi Hilal İŞLEROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimimin başından sonuna kadar çalışmalarımdayan yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygı değer ikinci danışmanım Dr.Öğr.Üyesi Mehmet TOKATLI'ya çok teşekkür ederim.

Aynı laboratuvarı paylaştığım, her zaman yanımda olan ve abim gibi gördüğüm değerli İzzet TÜRKER'e çok teşekkür ederim.

Bana en çok güvenen ve bu noktalara gelmemde en büyük emeği olan, annem Hatice DOMURCUK'a, saygıyı, sevgiyi, dürüstlüğü ve Beşiktaşlılığı bana öğreten, örnek aldığım insan, babam Özhan DOMURCUK'a, arkamda ileri güç olarak her zaman duran abim, İsmail Serhan DOMURCUK'a ve kardeşten öte bildiğim her çağırdığımda yardımına koşan Ferhat İBİŞ'e çok teşekkür ederim.

Tezime mali yönden destek olan TÜBİTAK-TOVAG'a (Proje no: 115 O 216) ve Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne (Proje no: 2016/59) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gökhan DOMURCUK  
9 Temmuz 2018



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ .....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Transglutaminaz Enzimi.....	3
2.2. TG Enziminin Gıda Endüstrisinde Kullanımı .....	5
2.3. Mikrobiyal Transglutaminaz (mTG) Enzimi .....	9
2.4. Mikrobiyal TG Enziminin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri .....	11
2.5. Mikrobiyal TG Enziminin Biyosentezi ve <i>Streptomyces</i> sp. Biyolojisi.....	13
2.6. Mikrobiyal TG Biyosentezini ve Aktivitesini Etkileyen Faktörler .....	16
2.6.1. Mikroorganizma .....	17
2.6.2. Besiyeri bileşimi.....	17
2.6.3. İnkübasyon sıcaklığı ve pH .....	22
2.6.4. Karıştırma şeklinin ve hızının etkisi.....	24
2.6.5. Mikrobiyal stres faktörleri.....	28
2.7. Enzim Saflaştırma Teknikleri.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	33
3.1. Materyal.....	33
3.2. Yöntem .....	33
3.2.1. <i>Streptomyces</i> türlerinin aktifleştirilmesi, saflık kontrolleri ve muhafazaları .....	33

3.2.2. Mikrobiyal TG enzim aktivitesinin belirlenmesi .....	35
3.2.3. Toplam protein miktarının ve mTG enziminin spesifik aktivitesinin belirlenmesi .....	36
3.2.4. Kültür ortamında biyokütle ağırlığının belirlenmesi .....	37
3.2.5. İnkübasyon sıcaklığı, besiyeri bileşimi ve başlangıç pH değerinin enzim üretimine etkisinin belirlenmesi .....	38
3.2.6. Çalkalamalı (orbital) inkübasyonun enzim üretimine etkisinin belirlenmesi .....	39
3.2.7. Kontrollü fermantasyon koşullarının ve radyal karıştırmanın enzim üretimine etkisinin belirlenmesi .....	40
3.2.8. Mikrobiyal stres faktörlerinin enzim üretimine etkilerinin belirlenmesi .....	41
3.2.9. Mikrobiyal TG enziminin kısmi saflaştırılması .....	43
3.2.10. Kısmi saflaştırılmış mTG enziminin karakterizasyonu .....	46
3.2.11. İstatistiksel değerlendirme .....	48
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	49
4.1. <i>Streptomyces</i> Türlerinin Aktifleştirilmesi, Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Saflık Kontrolleri .....	49
4.2. Enzim Üretimine Besiyeri Bileşimi, Başlangıç pH'sı ve İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi .....	51
4.3. TG Üretimine Karıştırma Şeklinin ve Hızının Etkisi .....	57
4.3.1. Çalkalamalı (orbital) karıştırmanın etkisi .....	57
4.3.2. Kontrollü fermantasyon ve radyal karıştırmanın etkisi .....	59
4.4. Mikrobiyal Stres Faktörlerinin Enzim Üretimine Etkisi .....	64
4.4.1. Sıcaklık stresi .....	64
4.4.2. Alkol stresi .....	67
4.4.3. Tuz ve kimyasal stresi .....	70
4.4.4. Proteolitik enzim stresi .....	77
4.5. Mikrobiyal TG Enziminin Kısmi Saflaştırılması .....	80
4.5.1. Amonyum sülfat [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] ile çöktürme .....	80

4.5.2. Alkol ile Çöktürme .....	83
4.5.3. Diyaliz işlemi .....	85
4.6. Kısmi Saflaştırılmış mTG Enziminin Karakterizasyonu.....	86
4.6.1. Enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi.....	86
4.6.2. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	88
4.6.3. Enzim aktivitesi ve stabilitesine pH ve sıcaklığın etkisi .....	90
4.6.4. Enzim aktivitesine metal iyonlarının ve EDTA'nın etkisi .....	94
5. SONUÇ .....	96
6. KAYNAKLAR.....	101
7. EKLER .....	110
8. ÖZGEÇMİŞ.....	128

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

Ba<sup>+2</sup>

Co<sup>+2</sup>

Cu<sup>+2</sup>

K<sup>+</sup>

K<sub>m</sub>

Li<sup>+</sup>

Pb<sup>+2</sup>

U

V<sub>max</sub>

Z-Gln-Gly

Zn<sup>+2</sup>

### Açıklama

Baryum

Kobalt

Bakır

Potasyum

Michaelis sabiti

Lityum

Kurşun

Ünite

Maksimum hız

N-Benziloksikarbonil-L-Glutaminglisin

Çinko

### Kısaltmalar

ANOVA

ARS

ATCC

BSA

CM

DO

DSMZ

EDTA

GNB

GYM

MIX

mTG

NRRL

rRNA

SDS

SDS-PAGE

TEMED

TG

USDA

### Açıklama

Varyans analizi

Tarımsal Araştırma Merkezi

Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu

Bovine Serum Albumin

Karboksimetil

Çözünmüş oksijen

Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültür Koleksiyonu

Etilendiamin tetra asetik asit

Glukoz Nişasta Besiyeri

Glukoz Maya Besiyeri

Karışım Besiyeri

Mikrobiyal transglutaminaz

Kuzey Bölgesi Araştırma Laboratuvarı-  
Tarımsal Araştırma Merkezi Kültür Koleksiyonu

Ribozomal ribonükleik asit

Sodyum dodesil sülfat

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

Tetrametiletildiamin

Transglutaminaz

Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı

## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Transglutaminaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar (a) Açıl transfer reaksiyonu (b) Protein veya peptitlerde bulunan glutamin ve lizin kalıntıları arasında çapraz bağlanma reaksiyonu (c) Deamidasyon.....	4
Şekil 2.2. Mikrobiyal TG enziminin üç boyutlu protein yapısı .....	12
Şekil 3.1. L-glutamik asit $\gamma$ -monohidroksimat için standart kurve grafiği.....	36
Şekil 3.2. Bovine Serum Albumin (BSA) için standart kurve grafiği .....	37
Şekil 3.3. Kontrollü ve radyal karıştırmalı fermentör sistemi .....	41
Şekil 4.1. <i>Streptomyces</i> kültürlerine ait Gram boyama görüntüleri (a) <i>S. ladakanum</i> , (b) <i>S. lividans</i> , (c) <i>S. mobaraensis</i> , (d) <i>S. platensis</i> .....	50
Şekil 4.2. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının <i>S. mobaraensis</i> türünün GNB ve MIX besiyerlerindeki (pH 6.0) enzim aktivitesine etkisi (a) 20°C, (b) 30°C, (c) 40°C .....	54
Şekil 4.3. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının <i>S. mobaraensis</i> türünün GNB ve MIX besiyerlerindeki (pH 7.0) enzim aktivitesine etkisi (a) 20°C, (b) 30°C, (c) 40°C .....	55
Şekil 4.4. Çalkalamalı (orbital) inkübatörde (30°C, pH 6.0) enzim üretim denemelerine ait (a) enzim aktivitesi (U/ml) ve (b) spesifik aktivite (U/g protein) değerleri .....	58
Şekil 4.5. Fermentörde farklı radyal karıştırma hızlarının (a) enzim aktivitesine (U/ml) (b) spesifik aktiviteye (U/g protein) etkisi .....	61
Şekil 4.6. Farklı karıştırma hızlarında gerçekleştirilen fermentasyonlarda biyokütle (g biyokütle/l) değişimi .....	62
Şekil 4.7. Fermentörde farklı hava akış hızlarının (a) enzim aktivitesine (U/ml) (b) spesifik aktiviteye (U/g protein) ve (c) biyokütle miktarına (g biyokütle/l) etkisi .....	63
Şekil 4.8. Farklı süre (1-5 dak) ve sıcaklıklarda (50-60°C) uygulanan stresin (a) enzim aktivitesine (U/ml) (b) spesifik aktiviteye (U/g protein) ve (c) biyokütle miktarına (g biyokütle/l) etkisi.....	66
Şekil 4.9. Besiyerine farklı oranlarda etanol ve metanol ilavesinin (a) enzim aktivitesine (U/ml) (b) spesifik aktiviteye (U/g protein) ve (c) biyokütle miktarına (g biyokütle/l) etkisi .....	69

Şekil 4.10. Farklı tuz streslerinin mTG aktivitesine etkisi (a) NaCl, (b) MgCl <sub>2</sub> , (c) KCl, (d) Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	72
Şekil 4.11. Farklı tuz streslerinin biyokütle miktarına etkisi (a) NaCl, (b) MgCl <sub>2</sub> , (c) KCl, (d) Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	73
Şekil 4.12. EDTA ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ilavesinin (a) enzim aktivitesine (U/ml) (b) spesifik aktiviteye (U/g protein) ve (c) biyokütle miktarına (g biyokütle/l) etkisi....	76
Şekil 4.13. Pepsin ve tripsin enzimlerinin (a) enzim aktivitesine (U/ml) (b) spesifik aktiviteye (U/g protein) ve (c) biyokütle miktarına (g biyokütle/l) etkisi .....	79
Şekil 4.14. Farklı tuz doygunluk derecelerinde çöktürme işlemlerinin enzim aktivitesine (U/ml) etkisi .....	81
Şekil 4.15. Farklı alkol konsantrasyonlarında çöktürme işlemlerinin enzim aktivitesine (U/ml) etkisi .....	84
Şekil 4.16. Kısmi saflaştırılmış mTG enzimine ait SDS-PAGE elektroforez görüntüsü. Kısmi saflaştırılmış mTG enzimi (hat 1), ticari mTG enzimi (hat 2), moleküler ağırlık standardı (hat S) .....	88
Şekil 4.17. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim aktivitesi üzerine substrat (S) konsantrasyonunun etkisi (Michaelis-Menten grafiği) .....	90
Şekil 4.18. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim aktivitesi üzerine substrat (S) konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk grafiği) (X eksen kesim noktası $-1/K_m$ , Y eksen kesim noktası $1/V_{max}$ ).....	90
Şekil 4.19. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim aktivitesine pH'nın etkisi .....	91
Şekil 4.20. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim stabilitesine pH'nın etkisi .....	92
Şekil 4.21. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	93
Şekil 4.22. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim stabilitesine sıcaklığın etkisi .....	94
Şekil 4.23. Metal iyonlarının ve EDTA'nın mTG enzim aktivitesine etkisi .....	95

## ÇİZELGE LİSTESİ

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 2.1. Gıda ürünlerinde TG kullanımı .....	6
Çizelge 2.2. Mikrobiyal TG enzim sentezinin biyolojik mekanizmasının açıklanması için yapılan çalışmalar .....	16
Çizelge 2.3. Mikrobiyal TG üretiminde kullanılan bazı stratejiler .....	16
Çizelge 3.1. Enzim üretiminin artırılması için hazırlanan deneme planı.....	38
Çizelge 3.2. GNB ve MIX sıvı besiyeri bileşimleri.....	39
Çizelge 3.3. Farklı konsantrasyonlarda metal ve EDTA içeren deney ortamının hazırlanışı .....	48
Çizelge 4.1. Farklı tuz doygunluk derecelerinde çöktürme sonrası verim (%), toplam protein ( $\mu\text{g/ml}$ ), spesifik aktivite (U/g protein) ve saflaştırma katsayısı değerleri.....	82
Çizelge 4.2. İki kademeli çöktürme sonrası verim (%), toplam protein ( $\mu\text{g/ml}$ ), spesifik aktivite (U/g protein) ve saflaştırma katsayısı değerleri .....	83
Çizelge 4.3. Farklı alkol konsantrasyonlarında çöktürme sonrası verim (%), toplam protein ( $\mu\text{g/ml}$ ), spesifik aktivite (U/g protein) ve saflaştırma katsayısı değerleri.....	85
Çizelge 4.4. Ultra-filtrasyon ve diyaliz torbası ile diyaliz işlemlerinden elde edilen veriler .....	86

## 1. GİRİŞ

Gıdalarda işlevsellik, ürünlerin duyuusal ve besleyici kalitesini etkilemesinden dolayı son yıllarda araştırmacılar ve gıda endüstrisi, gıda makro moleküllerinin teknolojik ve fonksiyonel özelliklerini değiştirebilecek yöntem ve ürün arayışlarını yoğunlaştırmışlardır. Proteinlerin organik materyallerin ana yapı taşı olmasından dolayı; enzimatik, kimyasal veya fiziksel olarak proteinlerin modifikasyonu, gıdaların fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesi ve geliştirilmesi için alternatif bir yöntem olabilmektedir (Min ve Green, 2008; Gaspar ve Goes-Favoni, 2015). Dünya genelinde yeni protein kaynaklarının aranması ve mevcut proteinlerin insan tüketimi için potansiyelini genişletmek son derece ilgi çekici bir konudur. Dolayısıyla, özellikle proteinlerin modifikasyonunda rol oynayan mikrobiyal enzimler, mevcut olan gıda proteinlerinin fonksiyonel özelliklerini ve besleyici değerini geliştirmek için büyük önem arz etmektedir. Enzimatik modifikasyon, hem ucuz olması, hem de sağlık açısından herhangi bir risk taşımaması gibi nedenlerle sıklıkla tercih edilmektedir. Gıda proteinlerinin enzimatik modifikasyonunda kullanılabilen enzimlerin sayısı ise oldukça sınırlıdır (Romeih ve Walker, 2017). Tirozinaz, lisil oksidaz, lakkaz, sortaz A ve transglutaminaz gibi bazı oksidaz ve açıl transferaz grubu enzimlerin in vitro şartlarda protein moleküllerinin modifikasyonunda (çapraz bağlama reaksiyonları) görev aldığı bilinmektedir. Tüm bu çapraz bağlayıcı enzimler farklı reaksiyon mekanizmaları ile proteinlerdeki aminoasit kalıntılarına etki etmektedir. Çapraz bağlama, doğrudan enzimatik reaksiyonun sonucu olarak veya enzimatik reaksiyon ile oluşan  $H_2O_2$  ve lipid radikallerinin çapraz bağlama etkisi ile gerçekleşebilir. Proteinler, çapraz bağlayıcı bu enzimler için reaktif olan glutamin, lizin, tirozin ve sistein kalıntıları gibi gruplara sahiptirler. Ancak bu enzimlerden birçoğunun kofaktörlere ihtiyaç duyması, enzimatik aktivitelerinin yetersiz olması ve üretimlerinin kısıtlı olması gibi faktörlerden dolayı gıda proseslerinde kullanımı sınırlıdır (Lantto, 2007; Heck ve ark., 2013). Elde edilen reaksiyonların başarısı, kullanılan enzim tipine, hedef reaktif grupların erişilebilirliğine ve kullanılan işlem koşullarına bağlıdır. Bu enzimler içerisinde özellikle transglutaminaz enziminin protein içeren tüm gıdalarda kullanıma uygun olması ve endüstriyel olarak üretilebilmesi, gıda endüstrisindeki önemini giderek arttırmaktadır. Hem akademik hem de endüstri açısından ilgi gören transglutaminaz enzimi, çapraz



bağlama teknolojisinde çoğu ticari uygulamalarda kullanılmaktadır (Romeih ve Walker, 2017).

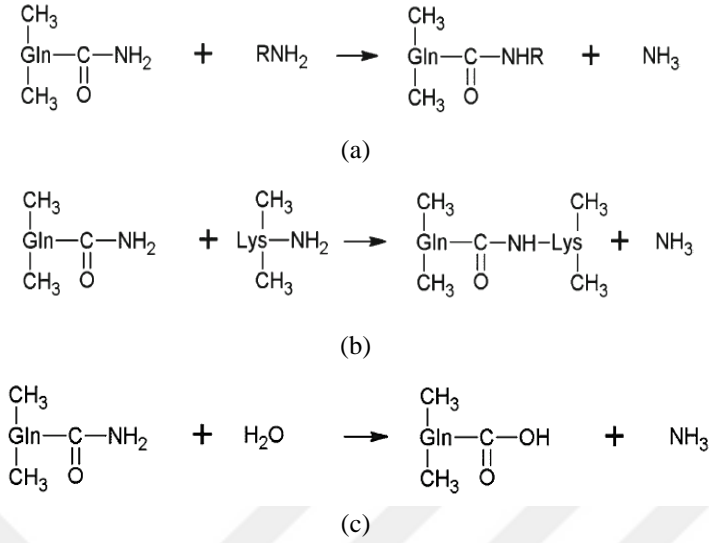
Transglutaminaz enzimi hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal olarak üretilmektedir. Yakın zamana kadar ticari olarak satılan transglutaminaz enzimi sadece hayvansal kaynaklardan elde edilirken özellikle son yıllarda mikrobiyal kaynaklardan transglutaminaz eldesi üretim maliyetini düşürmek amacıyla çalışılmaya başlanmıştır. Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen mikrobiyal kaynaklı TG (mTG) hayvansal kaynaklı TG'den farklı olarak aktivasyonunun kalsiyum iyonlarından bağımsız olması nedeniyle gıda endüstrisinde yaygın olarak tercih edilmektedir. TG üretimi için en uygun olan mikroorganizma *Streptomyces* türleridir (Motoki ve Seguro, 1998). *Streptomyces* türleri tarafından mTG üretiminin diğer mikroorganizma cinslerine göre önemli ölçüde fazla olduğu bilinmekte ve günümüzde endüstriyel olarak mTG üretimlerinde bu türler kullanılmaktadır. Bu yüzden *Streptomyces* türleri ile mTG verimini arttırmaya yönelik, substrat optimizasyonu, metabolik optimizasyon ve dış faktörlerin kontrolü (pH, çözünür oksijen ve sıcaklık) gibi bazı stratejiler üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Fermantasyonla ilgili bazı parametrelerin değiştirilmesi enzim üretiminde önemli değişikliklere sebep olabilmekte ve enzim verimindeki artışların maliyet açısından olumlu etkisi bulunabilmektedir (Zhang ve ark. 2009).

Yapılan tez çalışması, transglutaminaz enziminin farklı suşlardan mikrobiyal olarak üretilmesini, üretim koşullarının geliştirilmesini, enzim üretimine etki eden inkübasyon koşulları ile stres faktörlerinin belirlenmesini ve enzimin farklı yöntemler ile kısmi saflaştırılmasının gerçekleştirilerek karakterize edilmesini kapsamaktadır. Böylece, pahalı ve saflaştırma basamakları zor olan hayvansal kaynaklı transglutaminaz enzimi için alternatif mikrobiyal kaynakların araştırılması gerçekleştirilerek daha ucuz ticari enzim üretimine yönelik üretim ve saflaştırma basamakları belirlenmiştir. İleriki çalışmalarla üretimi ve saflaştırılması yapılan bu enzimin, işlenmesi ve toz ticari enzim formuna getirilmesi ile birlikte, mikrobiyal transglutaminaz tozları, ticari olarak satılan hayvansal kaynaklı ve pahalı olan transglutaminaz enzim preparatlarına alternatif, daha düşük maliyetli bir ürün olarak pazara girebilecektir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Transglutaminaz Enzimi

Transglutaminaz (protein-glutamine gamma-glutamyltransferase, EC 2.3.2.13), açıl transfer, çapraz bağlama ve deaminasyon reaksiyonlarını katalizleyen bir transferaz grubu enzimdir (Şekil 2.1). Transglutaminaz (TG) terimi ilk olarak, Gine domuz karaciğerinde gözlemlenen transamidasyon aktiviteyi tarif etmek üzere Clarke ve ark. (1959) tarafından kullanılmıştır. TG, protein molekülünde birinci derecede  $\epsilon$ -amin grupları (alıcı) ve glutamin (verici) kalıntılarının  $\gamma$ -amino karbonil grupları arasında isopeptid bağı oluşumunu katalizleyerek açıl transfer reaksiyonlarını oluşturmaktadır (Kieliszek ve Misiewicz, 2014). Eğer bir protein molekülünde açıl alıcısı olarak lizin aminoasidi bulunuyorsa polipeptid zincirinde lizin kalıntılarında açıl transferinin gerçekleşmesi moleküler içi veya moleküler arası çapraz bağlanma reaksiyonlarının ( $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys) başlamasına öncülük etmektedir (Kashiwagi ve ark., 2002). Ancak ortamda serbest amino gruplarının bulunmadığı durumda su molekülleri açıl alıcısı olarak davranmakta ve glutamin üzerinden deaminasyon reaksiyonları gerçekleşmektedir (Motoki ve Seguro, 1998; Kieliszek ve Misiewicz, 2014). TG tarafından gerçekleştirilen farklı reaksiyonlar ile proteinlerde meydana gelen bu büyük değişimler sonucu gıdaların, pH, renk, tat-koku ve besinsel kalitesinde herhangi bir olumsuz değişim olmaksızın, doku ve stabilitesinde (termal stabilite, viskozite, sineresis, emülsifikasyon, jelleşme, su tutma kapasitesi vb.) önemli bir iyileşme meydana gelmektedir. Ayrıca, esansiyel aminoasitlerin proteinlerin yapısına bu reaksiyonlar sonucu katılabilmesi, bu aminoasitlerce fakir olan gıdaların besleyici değerinin artırılmasını da sağlamaktadır (Ando ve ark., 1989; Kuraishi ve ark., 2001; Gaspar ve Goes-Favoni, 2015). Diğer taraftan TG ile gerçekleştirilen bu reaksiyonlardan, sentetik polimer film, enzim immobilizasyonu ve tekstil gibi diğer alanlarda da faydalanılmaktadır (Cui ve ark., 2007; Nagy ve Szakacs, 2008).



Şekil 2.1. Transglutaminaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar (a) Açıl transfer reaksiyonu (b) Protein veya peptitlerde bulunan glutamin ve lizin kalıntıları arasında çapraz bağlanma reaksiyonu (c) Deamidasyon (Kieliszek ve Misiewicz, 2014)

TG doğada yaygın olarak memeli dokularında, mikrobiyal hücrelerde, omurgasızlarda ve bitkisel dokularda (soya, yer elması) bulunmaktadır. Organizmada birçok fizyolojik fonksiyona sahip olan TG, kanın pıhtılaşması, bağışıklık sistemi ve fotosentez gibi olaylarda önemli rol oynamaktadır (Ando ve ark., 1989; Kashiwagi ve ark., 2002; Cui ve ark., 2007). Hayvansal ve bitkisel TG, mikrobiyal transglutaminaz (mTG) ile aminoasit kompozisyonları benzer bir homoloji göstermese de bu enzimlerin katalitik aktiviteleri ve biyokimyasal özellikleri birbirlerine çok benzerdir (Luciano ve Arntfield, 2012).

Bitkilerde birçok TG formu tanımlanmış ve birden fazla TG'nin bir bitkide veya bir organelde farklı işlev görebileceği de doğrulanmıştır. Bitkisel TG, bitkilerin büyüme ve gelişme süreçlerinde rol oynamaktadır. Kloroplastlarda bulunan TG enziminin, özellikle bitkilerin ışığa karşı olan duyarlılıklarında önemli rol oynadığı da yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Sobieszczuk-Nowicka ve ark., 2008; Campos ve ark., 2009; Kieliszek ve Misiewicz, 2014). *Arabidopsis* ve *Zea mays* kloroplastlarında 39 ve 58 kDa'luk iki TG enzimi moleküler düzeyde tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Mısır bitkisindeki enzimlerin sentezinin ve aktivitesinin ışığa bağımlı olduğu gösterilmiştir (Villalobos ve ark., 2004).

Hayvansal TG'ler, karaciğer, akciğer, bağırsak, kıl folikülleri, epidermis, prostat, plasenta ve kan gibi vücut sıvıları ve dokularında yaygın olarak bulunan  $Ca^{+2}$  bağımlı enzimlerdir. Memeli hayvanların vücut sıvılarından, insan plazma faktörü XIIIa veya trombin ile aktive edilmiş kan pıhtılaşma faktörü XIII olarak bilinen TG enziminin izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Özellikle, Gine domuzu karaciğerinden saflaştırılan TG enzimi iyi bir şekilde karakterize edilmiştir (Folk ve Cole, 1966; Chung ve ark., 1970; Gorman ve Folk, 1980). İnsan plazma faktörü XIIIa, plazmada lokalize olur ve kan pıhtılaşma oluşumu sırasında fibrin pıhtılarını stabilize ederek kan kaybını engeller. Dokusal TG ayrıca, hücrel matrislerin stabilizasyonu, çapraz bağlanmış hücre kılıflarının oluşumu, yara iyileşmesi ve hücrelerin tutunma süreçleri gibi birçok işleme de katılmaktadır (Leblanc ve ark., 2001). Dokusal TG'ler, doğrudan transamidasyon aktivitelerini sergileyemezler. Çünkü inaktif zimojenler (pro-TG) olarak sentezlenirler. Aktif olmayan zimojenler, proteolitik parçalanma, kalsiyum bağlanması, guanozin trifosfat (GTP) bağlanması veya bu mekanizmaların iki veya daha fazlasının kombinasyonları ile aktif hale getirilebilmektedir ve bu mekanizmalar enzimden enzime değişmektedir (Griffin ve ark., 2002). Hayvansal TG'nin endüstriyel uygulamaları yoğun bir şekilde incelenmiş olup, kıt kaynaklar, karmaşık ayırma ve saflaştırma prosedürleri, enzimin aktif hale gelebilmesi için trombine ve kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) iyonuna ihtiyaç duyması gibi faktörler hem maliyetler hem de teknik sebeplerden dolayı sanayideki uygulamasını sınırlandırmıştır (Yüksel ve Erdem, 2007).

## **2.2. TG Enziminin Gıda Endüstrisinde Kullanımı**

Proteinler, gıda maddelerinin çeşitli fiziksel ve fonksiyonel özellikleri için yapısal bir temel oluşturmaktadır. Proteinlerin modifikasyonu, çeşitli fizikokimyasal özelliklerin düzenlenmesine izin vermektedir. TG ile protein moleküllerine kovalent çapraz bağların eklenmesi, proteinlerin çözünürlük, su bağlama, emülsifikasyon kapasitesi, köpürme, viskozite, elastikiyet ve jelasyon özellikleri gibi fonksiyonel özelliklerini geliştirmekte uygun bir araç olmaktadır. TG tarafından katalizlenen  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)-lisin bağlarının oluşumu, proteinlerin çeşitli fonksiyonel özelliklerini iyileştirmek için etkili bir yöntem sunmaktadır. Proteinlerin TG ile post translasyonel modifikasyonu, proteinlerin kimyasal, enzimatik ve mekaniksel olarak dirençli ve güçlü olan büyük polimerlere

dönüşmesine neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan birçok patent başvurusu ve araştırma makalesi, duysal, dokusal ve besinsel özellikleri geliştirilmiş ürünlerin üretilmesine olanak tanıyan çapraz bağlı proteinlerin potansiyelini kapsamaktadır (Çizelge 2.1) (Li-Chan, 2004).

Çizelge 2.1. Gıda ürünlerinde TG kullanımı (Kieliszek ve Misiewicz, 2014)

Kaynak	Ürün	Etki
Et ve ürünleri	İşlenmiş et	Tekstür, görünüş ve sertlik
Balık	Balık ezmesi ve işlenmiş balık	Sertlik
Süt ve ürünleri	Krema, tatlılar, kaplamalar	Kalite ve tekstür
Kazein	Çapraz bağlı protein	Azaltılmış allerjenite
Buğday	Ekmek	Tekstür ve hacim
Jelatin	Şekerleme	Düşük kalori, iyi tekstür ve elastikiyet

Proteinlerin TG ile reaksiyona sokulmasının jelatin, kazeinat, serum proteini, soya proteini, yumurta sarısı, yumurta beyazı ve gluten gibi geniş bir alanda gıda proteini için kovalent olarak çapraz bağlanmış jel/kolloidlerin üretilmesini sağladığı bilinmektedir. Ancak çapraz bağlanma oranı her bir proteinin makromoleküler yapısıyla yakından alakalı olduğu için, bu proteinlerin hepsi ideal substratlar değildir (Schorsch ve ark., 2000; Yüksel ve Erdem, 2007).

TG enziminin ana endüstriyel uygulamalarından biri et ürünlerinin yeniden yapılandırılmasıdır. Enzim ile oluşturulan çapraz bağlar sayesinde, pişirme sırasında daha iyi mekanik (dokusal) özellikler, daha az kayıp ve stabilite sağlamaktadır (Kuraishi ve ark., 2001). TG preparatlarının kullanımı son ürünün dokusal özelliklerinde önemli ölçüde olumlu etki yapmanın yanı sıra ısıl işlem, tuz veya fosfatların eklenmesine gerek kalmadan et parçalarının güçlü bir şekilde birleşmesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, domuz, sığır eti veya kümes hayvanı etinden yapılan homojenize sosislerin dokusunu da güçlendirmektedir. TG enzimi et ürünlerinde, eksik olan aminoasitlerin (lizin) takviye edilerek daha yüksek besleyici değere sahip et ürünlerinin üretimine olanak sağlamaktadır. Ayrıca kollajen, kan proteinleri ve kemikten mekanik olarak sıyrılmış et gibi daha düşük kaliteli hammaddelerin

kullanılmasına izin vermektedir. TG uygulaması ince ve kaba kıyılmış sosisler ve fme et üretimi için yeni teknolojik fırsatlar yaratmıştır. Yüksek kaliteli et yerine, yağsız süt tozu, soya veya buğday unu gibi daha düşük maliyetli hammaddeler ve katkı maddeleri bu tür ürünleri üretmek için kullanılabilir. Enzimin hammaddelerdeki proteinler üzerindeki etkisi ile yüksek kaliteli etlerden yapılan ürünlerden görünüm, doku, tat ve besin değeri açısından farklı olmayan ürünlerin üretimini sağlamaktadır (Motoki ve Seguro 1998). TG enziminin kazein proteini ile birlikte kullanımı sonucu daha az yağ içeriğine sahip işlenmiş etlerin üretimi mümkün olmaktadır (Nielsen, 1995).

Süt rnlerinde ise özellikle yoğurt retiminde TG enzimi kullanıldığında, yoğurt jelinin su tutma kapasitesini arttırarak sineresis (su salma) olayını azaltmaktadır (Motoki ve Seguro, 1998; Yokoyama ve ark., 2004). Peynir retiminde ise TG kullanımı pıhtı ve peynir veriminde artış sağlamaktadır. Peynir retiminde TG enziminin kullanımı 3 farklı şekilde uygulanabilmektedir. Bunlardan ilki, süte TG ilavesi yapıldıktan sonra pastörizasyon ve pıhtılaştırma işlemine geçilmesi; ikincisi, pıhtılaşma sonrası TG ilavesi; ncs, TG ve rennetin aynı anda ilave edilerek pıhtılaşma gerçekleştirilmesidir (Kuraishi ve ark., 2001). Yapılan bazı çalışmalarda TG enziminin pıhtılaştırma işleminden önce ilave edilmesinin sütün koagülasyonuna engel olduğu belirtilirken, TG enziminin rennet ile eř zamanlı ilavesinin peynir altı suyundaki protein ve yağ miktarını azaltarak peynirin sertliğini ve dayanımını düşürdüğü belirtilmektedir (Kieliszek ve Misiewicz, 2014). Monogioudi ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada pepsin ile sindirime karşı, enzimatik olarak çapraz bağlanmış  $\beta$ -kazeinin çapraz bağlanmamış  $\beta$ -kazeine göre daha dirençli olduğunu göstermişlerdir.

Fırıncılık rnlerinde TG enzimi, unların kalitesinin iyileştirilmesinde, ekmek hacminin ve dokusunun geliştirilmesinde, hamurun pişirme sonrası dokusal özelliklerinin arttırılmasında kullanılmaktadır. TG enzimi fırıncılık ürünlerinde prolamin içeren polipeptid zincirleri arasında bağlantılar oluşturmaktadır. Pirinç unu ile yapılan bir çalışmada un içerisine mTG enziminin ilavesinin hamurun reolojik özelliklerinde gelişme sağladığı gösterilmiştir (Gujral ve Rosell, 2004). Ayrıca, glutamin ve TG ilavesi ile izopeptid bağlarının oluşumu, peptid fragmentlerinin insan T hücreleri tarafından tanınmasını engelleyerek lyak hastalığının gelişmesine yol açan mekanizmayı bloke edebileceği dşnlmektedir (Kieliszek ve Misiewicz, 2014).

TG enzimi protein içeren birçok gıdanın üretiminde etkili bir şekilde kullanılmakla birlikte özellikle bitkisel orijinli gıdalarda kullanımı henüz çok yaygınlaşmamıştır (Gaspar ve Goes-Favoni, 2015). TG soya globülinlerinde modifikasyona yol açacak şekilde çapraz bağlanma reaksiyonlarını katalizleyerek soya fasulyesinden elde edilen ürünlerinin jelasyon ve dokusal özelliklerini geliştirmektedir. Soya fasülyesi proteinlerinin pıhtılaştırılmasıyla elde edilen bir soya fasulyesi ürünü olan tofunun TG ile muamele edilmesi sonucu su tutma kapasitesinin artarak daha iyi dokusal özellikler kazandırıldığı yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Soya protein izolatlarının hem koagülasyon hem de jelleşme özelliklerinin artan enzim konsantrasyonu ile artırıldığı gösterilmiştir. TG ayrıca soya proteininin sindirim özelliklerini geliştirmek için kullanılmıştır (Nonaka ve ark., 1994). Enzim uygulamaları soya fasülyesinde bulunan bazı protein fraksiyonlarının alerjen özelliklerinin ortadan kaldırılmasında da etkin bir şekilde uygulanabilmektedir (Babiker ve ark., 1998).

TG enzimi, kazein, jelatin ve kazein-jelatin karışımlarından yenilebilir filmler üretmek için kullanılmaktadır. Bu şekilde oluşturulan yüksek moleküler ağırlığa sahip yenilebilir filmler, yüksek esneme ve düşük su buharı geçirgenliğine sahiptir (Chambi ve Grosso, 2005). Kitosan ve peynir altı suyu proteinlerinin TG enzimi ile çapraz bağlanması ile yenilebilir filmler oluşturulmuştur. Üretilen filmlerin, geniş bir pH aralığında düşük çözünürlük, daha düşük şişme özelliği, proteaz enzimlerine karşı duyarlı, iyi bir mekanik direnç ve az deforme olan özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Filmlerin ayrıca oksijen, karbondioksit ve su buharına karşı iyi bir bariyer özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan peynir altı suyu proteinleri ve 11s globülin proteinleri TG kullanılarak çapraz bağlanmış ve filmlerin mekanik özellikleri geliştirilmiştir. Yenilebilir filmler, parça etlerde ve yüksek nemli düşük şekerli keklerde mikrobiyal ve fiziko-kimyasal kalite değişimlerini önlemek için bir bariyer olarak kullanılabilir (Yıldırım ve Hettiarachchy, 1998).

Beslenme açısından TG enzimi, bazı aminoasitleri veya peptitleri substratı olan proteinlere kovalent olarak bağlayarak yapıya dahil edebilir. Bu reaksiyon ile kovalent olarak yapıya dışarıdan katılan aminoasitler gıda maddelerinin veya hayvan beslenmesinde kullanılan yemlerin besin değerini arttırabilmektedir. Örneğin, metiyonin ve lizin açısından fakir olan süt kazein proteinleri ve soya fasulyesi proteinleri bu tip TG

reaksiyonu ile zenginleştirilebilmektedir. Pratik uygulamalarda, lisin hariç tüm yaygın aminoasitlerin  $\alpha$ -karboksil gruplarının negatif yüklerini ortadan kaldırmak için amitlenmiş, esterlenmiş veya dekarboksile edilmiş olmalıdır.  $\alpha$ -amino grubu birincil amin olan lisin aminoasiti, TG için iyi bir substrat konumundadır. Bu tür reaksiyonlarda proteinler açıl donörleri olarak etki gösterirken, lisin gibi aminoasitler ise açıl akseptörler olarak görev yapmaktadır. Örneğin, metiyonin eksikliğine karşı kazeinlere lisil-metiyonin eklenebilmektedir. Benzer şekilde, arjinin eksikliğini gidermek için lisil-arjinin kazeinlere dahil edilebilir. Diğer taraftan gıda endüstrisinde glutamin içeren peptitlerin uygulanması oldukça karmaşıktır (Yokoyama ve ark., 2004).

Protein immobilizasyonu, geleneksel immobilize enzimlerin hazırlanması için yaygın bir teknik olarak kullanılmaktadır ve biyoteknolojik uygulamalarda anahtar bir tekniktir. Proteinlerin katı desteklere işlevsel olarak immobilizasyonu, reaksiyon ortamından kolay ayrılma ve tekrar tekrar kullanım olasılığı gibi immobilize olmayan enzimlere göre çeşitli avantajlar sunmaktadır. TG enzimi, kazein kaplı poliakrilik reçine üzerine kısa bir peptit ile tutturulmuş alkalın fosfatazın immobilizasyonu için başarıyla kullanılmıştır. TG kullanılarak hazırlanan immobilize enzimin, fiziksel adsorpsiyon yolu ile hazırlanandan çok daha yüksek aktivite sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca, enzimatik immobilizasyon tekniğinin fiziksel adsorpsiyon tekniğine kıyasla enzimin tekrarlanan kullanımında daha yüksek stabilite sağladığı ortaya konmuştur (Tominaga ve ark., 2007). Diğer taraftan, TG özellikle biyosensörlerin geliştirilmesinde güçlü bir araç haline gelmektedir. Glukoz oksidaz enzim tabakasının TG aracılığıyla elektrot üzerine bağlanması ile hazırlanan biyosensörler geliştirilmiştir (Josten, 1999).

### **2.3. Mikrobiyal Transglutaminaz (mTG) Enzimi**

Enzimler, ilaç ve gıda ürünlerinin üretimi, tekstil, deri işleme ve atık su arıtma gibi birçok endüstride yaygın olarak kullanılan biyolojik katalizörlerdir ve kullanılan enzimlerin çoğunluğu mikrobiyal kökenlidir. Çünkü bu enzimler bitkilerden ve hayvanlardan elde edilen enzimlere göre nispeten daha stabildirler ve üretim maliyetleri daha düşüktür. Biyoteknolojik olarak amilazlar, selülozlar, proteazlar ve pektinazların potansiyel uygulamaları farklı endüstrilerde yaygın kullanım alanı bulmuştur. Biyoteknolojideki ilerlemeler ve diğer alanlarındaki gelişmeler, gıda, yem ve ilaç



endüstrilerinde çok çeşitli yeni enzimlerin kullanılmaya başlanmasına sebep olmuştur. Gıda endüstrisinin yeni özelliklere sahip enzimlere karşı artan talebi, özellikle bu enzimleri üreten güvenli statüdeki mikroorganizmalara olan arayışı da arttırmıştır (Mabel ve Prapulla, 2012).

Mikrobiyal transglutaminaz (mTG) lizin içeren proteinlerin glutamin kalıntılarının  $\gamma$ -karboksiamid grupları ile birincil aminler arasında açıl transfer reaksiyonunu katalizleyen  $Ca^{+2}$ 'den ve kofaktörlerden bağımsız bir enzimdir. İlk olarak Ando ve ark. (1989) yaptıkları çalışmada topraktan izole ettikleri *Streptovercillium* S-8112 suşundan mTG enzimini elde etmişlerdir. Bu mikroorganizma sıvı besiyerinde enzimi hücre dışına salgıladığı için hücre parçalanmasına gerek duyulmadan kolaylıkla enzim saflaştırılabilmiş ve karakterize edilmiştir (Zhu ve ark., 1995). Diğer mikroorganizmalar tarafından üretilse de ticari olarak mTG, *Streptovercillium moboarense* (*Streptomyces moboarense*) tarafından fermantasyon yolu ile üretilmektedir (Ando ve ark., 1989). İlk ticari mTG (Activa<sup>TM</sup> MP) *Streptovercillium mobaraense* fermantasyonu ile Ajinomoto (Japonya) firması tarafından süt ürünlerinde kullanılmak üzere üretilmiş olup, yoğurt ve dondurmalarda doku gibi fiziksel özellikleri iyileştirmek, düşük ve tam yağlı yoğurtlarda pıhtı kırılma mukavemetini arttırmak, stabilizör kullanımını azaltmak gibi fonksiyonları bulunmaktadır. mTG'nin  $Ca^{+2}$ 'den bağımsız bir enzim olması, kazein, soya proteinleri ve miyosin gibi kalsiyum duyarlı gıda proteinlerinin fonksiyonlarının modifiye edilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca mTG iki farklı gıda proteini arasında çapraz bağlar oluşturabilmekte, böylelikle daha yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin oluşumunu sağlayabilmektedirler (Motoki ve Seguro, 1998; Zhang ve ark., 2009). mTG enziminin, 1998'den beri FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından insan beslenmesi için güvenli bir madde olarak (GRAS- Genel Olarak Güvenli Olduğu Kabul Edilen) tanınmasıyla birlikte, gıda endüstrisi için çok çekici bir hale gelmiştir (Aalami ve Leelavathi, 2008). Birçok gıda kodeksinde, gıdalarda mTG'nin istenen etkiyi elde etmek için yeterli miktarlarda kullanılmasına izin vermekte ve izin verilen maksimum sınırlar için herhangi bir spesifikasyon belirtilmemektedir (Gaspar ve Goes-Favoni, 2015).

Mikrobiyal TG tipik memeli transglutaminazından farklıdır. Deneysel olarak memeli karaciğerinden elde edilen transglutaminazlar enzimatik aktivitesi açısından  $Ca^{+2}$

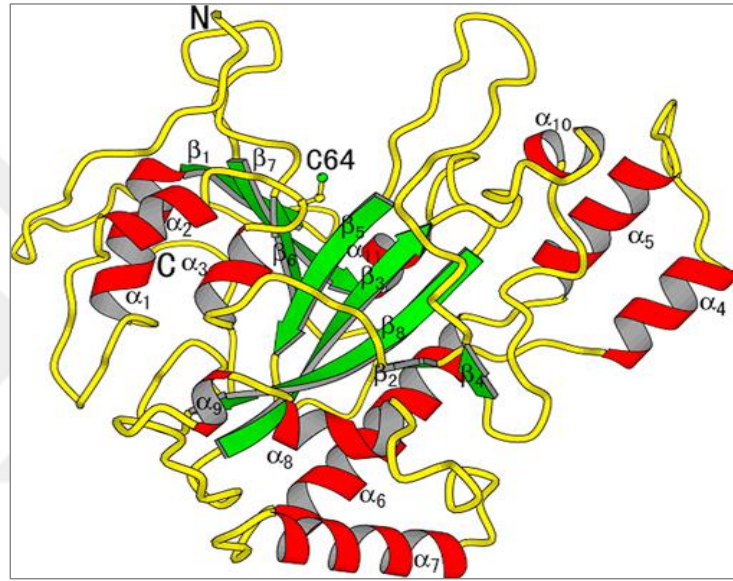
iyonuna gerek duymaktadır. mTG enzimin karakteristik özelliği  $Ca^{+2}$ 'den bağımsız katalizör olmasıdır. Bu özellik gıda proteinlerine uyarlanması açısından çok önemlidir. Çünkü, kazeinlerde olduğu gibi çoğu gıda proteini düşük kalsiyum iyon derişiminde çökme eğilimi göstermektedir (Zhang ve ark., 2009). Ayrıca mTG'nin aktivite için trombine ihtiyaç duymaması da gıdalarda kullanımında renk bakımından herhangi bir sorun yaratmamaktadır. Mikrobiyal TG, kültür besiyerine salgılandığı için hayvansal TG enzimine göre saflaştırma işlemi daha kolay gerçekleşmektedir (Motoki ve Seguro, 1998). Sonuç olarak, mTG'nin diğer TG'lere göre daha fazla protein substratı ile reaksiyona girmesi, aktivasyonu için kalsiyum iyonuna ve trombine ihtiyaç duymaması, ekstraselüler olarak üretilebilmesi ve fermantasyon teknolojileri kullanılarak düşük maliyetle üretiminin sağlanması gibi sebeplerle ticari olarak önemi oldukça artmıştır (Kurt ve Zorba, 2004). Enzimin, doğrudan TG üreten mikroorganizma kültürleri veya genetik modifiye edilmiş *E.coli*, *Bacillus*, *Aspergillus* ve bazı mayalardan mikrobiyal yolla ticari olarak üretilmesi temel yaklaşımlar olup, genetik modifikasyon yolu ile üretilerek ticari ürün haline getirilmiş enzim henüz bulunmamaktadır.

#### **2.4. Mikrobiyal TG Enziminin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri**

Mikrobiyal TG enziminin kimyasal yapısı incelendiğinde 331 aminoasit kalıntısından ve tek bir polipeptid (monomerik) zincirden oluştuğu ve moleküler ağırlığının ise yaklaşık 38 kDa olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, Gine domuzundan elde edilen TG enziminin ise monomerik bir yapıda ve moleküler ağırlığının yaklaşık 75 kDa olduğu saptanmıştır (Ando ve ark., 1989; Kieliszek ve Misiewicz, 2014). Kimyasal yapı olarak mTG, daha yüksek katalitik aktivite, daha küçük boyut, daha geniş substrat spesifitesi ve daha düşük deamidasyon aktivitesi gibi ticari amaçlar için değerli olarak kabul edilen biyokimyasal özellikler göstermektedir (Kashiwagi ve ark., 2002). Mikrobiyal TG enziminin aminoasit dizilimi hayvansal TG'ye göre çok farklı olsa da özellikle aktif merkezde yer alan sistin kalıntılarının çevresinde ve bazı bölgelerinde benzerlikler göstermektedir.

Mikrobiyal TG, katalitik aktiviteden sorumlu olan serbest tiyol (-SH) grubuna sahip tek bir sistin (Cys-64) kalıntısı içermektedir (Şekil 2.2). Bu yapı mTG'nin tiyol grubu bir enzim ailesinin üyesi olduğunu göstermektedir. Mikrobiyal TG disk benzeri bir şekle

sahiptir. Aktif bölge, diskin kenarındaki derin bir yarığın altında bulunur. Enzim, 11 adet  $\alpha$ -heliks ve 8 adet  $\beta$ -plakalarını içeren  $\alpha$  ve  $\beta$  katlanma tipi sergilemektedir. Cys-64'ün yanı sıra, Asp-255 ve His-274 kalıntıları katalitik üçlü yapıyı tamamlamaktadır. Asp-255 ve His-274 aminoasitlerinin enzim molekülündeki üç boyutlu pozisyonu, diğer aminoasitlerin pozisyonunu düzenlemektedir. Mikrobiyal TG'nin katalitik mekanizmasında, aktif merkezde yer alan aminoasitin (Asp-255) asit/baz katalizörü olarak görev aldığı bilinmektedir (Kanaji ve ark., 1993; Yokoyama ve ark., 2004).



Şekil 2.2. Mikrobiyal TG enziminin üç boyutlu protein yapısı (Kashiwagi ve ark., 2002)

Ek olarak, tüm DNA kodlama bölgesinin analizi sonucu, mTG'nin 406 aminoasitten oluşan öncül bir pro-enzim olarak sentezlendiğini göstermiştir. Enzim molekülündeki pro-bölgenin, amino terminalinde 18 aminoasitlik bir hidrofobik zincirden oluştuğu belirlenmiştir (Pasternack ve ark., 1998).

Mikrobiyal TG enzimi geniş bir pH aralığında çalışmakla birlikte optimum çalışma pH aralığı 5.0-8.0 arasındadır. Ayrıca pH 4.0 ve 9.0'da az da olsa enzimatik aktiviteye sahiptir. Mikrobiyal TG'nin izoelektrik noktası yaklaşık pH 8.9'dur. Birçok hayvansal TG'nin optimum çalışma ortamı 40°C ve pH 5.5'tir (Ho ve ark., 2000). *Streptomyces* sp. tarafından üretilen mTG'nin enzimatik aktivite açısından optimum çalışma sıcaklığı 45-50°C'dir ve aktivitesini 50°C'de 10 dakika boyunca sürdürebilmektedir. Diğer taraftan sıcaklığın 70°C'ye yükselmesi ile aktivitesini birkaç dakika içinde kaybedebilmektedir. Mikrobiyal TG, 10°C ve donma noktasında da bir miktar aktivite gösterebilmektedir

(Zhu ve ark., 1995; Motoki ve Seguro, 1998). Mikrobiyal TG enzimi etanol varlığında ısıtılmaya karşı hassastır ve maltodekstrin, sakkaroz, mannoz gibi karbonhidratların varlığında termal stabilitesi önemli ölçüde artmaktadır (Cui ve ark., 2006). Kazein proteinleri ise mTG enzimini hücre dışı proteolitik enzimlerin etkisine karşı korumaktadır (Junqua ve ark., 1997).

$\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$  ve  $\text{Li}^{+}$  gibi metal iyonları mTG'yi önemli ölçüde inhibe etmektedir. Çünkü ağır metaller mTG'nin aktif bölgelerinin bir parçası olan sistein uçlarındaki tiyol gruplarını bağlarlar (Yüksel ve Erdem, 2007). Mikrobiyal TG'nin aktif bölgesinde bulunan bu grup nedeniyle belirli şartlar altında enzim okside olabilmektedir. Bu nedenle özel paketlerde ve genel olarak maltodekstrin veya bir diğer inert taşıyıcı ile standardize edilmiş olarak satılmaktadır (Payne, 2009). Diğer taraftan TG enzim aktivitesi  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$  ve  $\text{K}^{+}$  iyonlarının varlığında artmaktadır (Macedo ve ark., 2010). Substrat spesifikliğı açısından birçok gıda proteininin (globülinler, gluten, albümin, aktin, miyosin, fibrin, kazein,  $\alpha$ -laktoalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin) çapraz bağlanma reaksiyonlarında aktif olarak rol oynamaktadır (Yokoyama ve ark., 2004).

## **2.5. Mikrobiyal TG Enziminin Biyosentezi ve *Streptomyces* sp. Biyolojisi**

1980 yıllarının sonlarından itibaren mikroorganizmalardan  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarına ihtiyaç duymayan TG elde edilebilmektedir. *Streptomyces* (*Streptoverticillium* sp.) türleri tarafından sentezlenen TG enzimi özellikle hayvansal kaynaklardan üretilen TG'den daha yüksek aktiviteye sahiptir. Ayrıca, mikrobiyal fermantasyon teknikleri TG'nin düşük bir maliyetle seri üretimine olanak tanımakta, bu da eczacılık ve kozmetik ürünler ile gıda teknolojisinde endüstriyel uygulamalar için avantaj sağlamaktadır (Zhu ve ark., 1995). Motoki ve ark. (1989) ve Ando ve ark. (1989) mikroorganizmalardan TG üretme olasılığını araştırmışlardır. Ando ve ark. (1989) çeşitli ortamlardan aldıkları toprak numunelerinden izole ettikleri yaklaşık 5000 suşu mTG enzim üretimi bakımından taramışlardır. Bu suşlar arasında *Streptoverticillium* sp. S-8112'nin iyi bir enzim oluşturma kabiliyetine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Motoki ve ark. (1989) *S. griseoaraneum*, *S. cinnamoneum* ve *S. mobaraense* gibi diğer bazı *Streptoverticillium* suşlarının da TG üretme kabiliyetine sahip olduğunu bildirmişlerdir. TG aktivitesi *Candida albicans*, *Phytophthora soja* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi

mikroorganizmalarda hücre duvarında lokalize olarak bulunmaktadır. Bu durum enzimin hücre duvarının stabilizasyonuna ve miselyumların büyümesi sırasında hif oluşumuna katıldığına işaret etmektedir. Aslında, enzimin *Streptomyces*'in yaşam döngüsündeki kesin rolü açıklanmamasına rağmen, protein çapraz bağlanma reaksiyonlarının misel hücre duvarının ve spor kılıfının güçlendirmesine katkı sağladığı düşünülmektedir (Mariniello ve ark., 2008).

*Streptomyces* türleri ilk kez 1943'te Waksman ve Henrici tarafından tanımlanmıştır (Williams ve ark., 1983). *Streptomyces* cinsi *Streptomycetaceae* ailesine aittir. Genel olarak *Streptomycetaceae* ailesi fizyolojik ve morfolojik özellikler, hücre duvarının kimyasal bileşimi, peptidoglukan türü, fosfolipidler, yağ asitleri, G/C içeriğinin yüzdesi, 16s rRNA analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu ile ayırt edilebilmektedir. Tanımlanan türlerin sayısı ve çeşitliliği açısından, *Streptomyces* türleri Actinomycetes sınıfının en büyük taksonomik ögelerinden birini temsil etmektedir (Bhattacharyya ve Sen, 1998; Hasani ve ark., 2014). *Streptomyces* cinsinde 500'den fazla tür tanımlanmış olup, doğal olarak bulunan antibiyotiklerin yaklaşık üçte biri bu türler tarafından üretilmektedir. Bazı *Streptomyces*'ler insanlar da dahil bazı hayvanlar ve bitkiler için patojendir ve metabolizmaları oksidatif tipte olup organik bileşiklerin büyük bir bölümünü enerji ve büyüme için tek karbon kaynağı olarak kullanabilirler. Bu cinsin üyeleri doğal habitatlarda yaygın olarak bulunurlar ve özellikle gübreli ve çürümüş bitki atıkları içeren topraklarda boldur. Suşların büyük bir kısmı 25-35°C'de ve pH 5-8 arasında iyi gelişirler (Mohanraj ve Sekar, 2013).

Gram pozitif (+) hücre morfolojisi gösteren ve spor oluşturan *Streptomyces* cinsine ait bakteriler, çok karmaşık bir büyüme döngüsüyle karakterizedir. Başlangıçta spor çimlenir ve küçük bir germ tüpü oluşur. Bu oluşan başlangıç miselyumlar, vejetatif hifleri oluşturmak üzere uzayarak dallanmaya başlar. Sıvı kültürde gelişen çoğu *Streptomyces* türleri hava miselleri oluşturmaz ve çok az suş sıvı kısmı içerisinde spor oluşturacak kapasiteye sahiptir. Katı ortamda koloniler nispeten pürüzsüz bir yüzeye sahiptir. Ancak daha sonra, granül, toz veya kadife gibi görünebilen hava miselyumları geliştirirler. Katı kültürde, substrat miselyumu olarak da adlandırılan vejetatif miselyum, substrat boyunca uzanır ve besinler harcandığında, hava hifleri oluşmaya başlamaktadır. Sıvı kültürde sporulasyon gerçekleşmez iken, ikincil metabolizma

tetiklenerek sekonder antibiyotikler ve bazı enzimler üretilebilmektedir. *Streptomyces* türlerinin bu şekilde sıvı besi ortamlarında substrat miselyumları oluşturarak çoğalmaları, hücrel çökelti veya öbekler oluşturarak kültür ortamında kütle transferi problemlerine sebep olmaktadır. Kültür ortamında meydana gelen bu karmaşık morfolojik davranış kültür ortamında heterojenlik yaratarak örneklemlerde ve verilerin analizinde zorluk oluşturabilmektedir (Manteca ve ark., 2010; Rattleff, 2013; Chen ve ark., 2013). Ayrıca TG üreticisi *Streptomyces* suşlarında meydana gelen bu morfolojik değişim ve misel gelişimi ile birlikte enzim aktivitesinde bir artışın olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Ancak bu durumun TG enzimi ile ilişkili olan mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Negus, 2001).

*Streptomyces* türleri, ikincil metabolitlerin üretimi açısından iyi bir kaynak olması nedeniyle, uzun zamandır bu amaçlar doğrultusunda kullanılmaktadır. Birçok yaşam alanına sahip *Streptomyces*'ler, hem potansiyel ürünleri için hem de bazı diğer metabolitler için konakçı olarak kullanılmaktadır. Saprofitik yaşam döngüleri sayesinde *Streptomyces* türlerinin yüksek miktarda protein (enzim) sentezleyerek makro boyuttaki hücrel substratları kullanma yetenekleri gelişmiştir (Rattleff, 2013).

*Streptomyces* tarafından üretilen TG enziminin aktivasyon mekanizması Pasternack ve ark. (1998) tarafından açıklanmıştır. Yaptıkları çalışmada TG enziminin bakteri tarafından pro-transglutaminaz (pro-TG) formunda sentezlendiğini ve enzimin aktifleştirilmesinde bazı ekzojen proteazların (tripsin, kimotripsin) görev aldığını belirlemişlerdir. Ayrıca endojen TG aktifleştirici proteaz olarak rol alan bir metalloproteaz enzimi *Streptomyces mobaraensis*'ten izole edilmiştir (Zotzel ve ark., 2003). Daha sonra yapılan çalışmalarda *Streptomyces hygroscopicus*'ta sadece endojen metalloproteazın değil aynı zamanda endojen serin proteazın TG aktivasyonunda rol oynadığı bulunmuştur (Zhang ve ark., 2008b). *Streptomyces* tarafından üretilen pro-TG'nin N-terminalinden önce serin proteaz ve metalloproteaz için bölünme yerlerini içeren, korunmuş bir aminoasit dizisine sahip olduğu görülmektedir. Bu da pro-TG'nin aktivasyonunun spesifik bir süreç olmadığını göstermektedir (Zhang ve ark., 2008b). Hem *S. mobaraensis* hem de *S. hygroscopicus* üzerinde yapılan araştırmalar, TG aktivasyon sürecinin bir TG inhibe edici proteaz inhibitörü tarafından engellendiğini kanıtlamıştır. Metalloproteaz, serin proteaz ve *Streptomyces subtilisin* inhibitör proteini,

TG aktivasyon sürecine dahil olan kilit faktörlerdir. Mikrobiyal TG'nin, hücre büyümesi sırasında değil, farklılaşma sırasında salgılanıp aktive olduğu belirlenmiştir (Zhang, ve ark., 2008a; Zotzel ve ark., 2003). Mikrobiyal TG sentezinin mekanizmasının açıklanmasına yönelik yapılmış çalışmaların kronolojik sıralaması Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Mikrobiyal TG enzim sentezinin biyolojik mekanizmasının açıklanması için yapılan çalışmalar

Yıl	Yapılan Çalışma	Kaynak
1989	Mikroorganizmalardan üretilen yeni bir TG'nin saflaştırılması ve özelliklerinin belirlenmesi	(Ando ve ark., 1989)
1998	<i>S. mobaraensis</i> 'ten bakteriyel pro-TG zimojenin saflaştırılması, karakterizasyonu	(Pasternack ve ark., 1998)
2003	<i>S. mobaraensis</i> 'ten elde edilen TG, endojen bir metalloproteazla aktifleştirilmesi	(Zotzel ve ark., 2003)
2008	<i>S. hygroscopicus</i> 'ta bulunan iki farklı proteazın TG aktivasyonundaki rolü	(Zhang ve ark., 2008b)
2009	<i>S. hygroscopicus</i> 'un farklılaşmasında TG'nin etkisi	(Zhang ve ark., 2009)

## 2.6. Mikrobiyal TG Biosentezini ve Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Mikrobiyal TG üretimi için gerekli olan fermantasyon şartları ile enzim üreticisi hücrelerin gelişimi için gerekli olan şartlar farklı olabilmektedir. Kesikli bir kültürde mTG oluşum hızı, aktivitesi ve verimliliği; pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen gibi çevresel parametrelere ve ortam bileşimine göre değişebilmektedir. Mikrobiyal TG sentezi konusunda giderek artan bilgiler ışığında, biosentez sürecini daha doğru bir şekilde kontrol edebilmek için farklı teknikler ve stratejiler geliştirilmiştir. Bu teknikler temelde, suş izolasyonu, inkübasyon şartlarının kontrolü, substrat optimizasyonu, metabolik optimizasyon ve fermantasyon teknikleri gibi unsurları kapsamaktadır (Çizelge 2.3) (Zheng ve ark., 2002a; Zheng ve ark., 2002b; Yan ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2009). Mikrobiyal hücreler uzun süredir hem metabolitlerin hem de proteinlerin (enzimler) üretimi için kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların üretim araçları olarak kullanılması, hızlı gelişme oranları ve basit biyolojilerinden dolayı faydalıdır (Zhang ve ark., 2009).

Çizelge 2.3. Mikrobiyal TG üretiminde kullanılan bazı stratejiler (Zhu ve Tramper, 2008)

Suş	Teknik	Ulaşılan aktivite (Ünite/ml)	Kaynak
<i>S. mobaraense</i>	Suş izolasyonu	2.00	(Ando ve ark., 1989)
<i>S. mobaraense</i>	Çevresel kontrol stratejileri	3.37	(Zheng ve ark., 2001)
<i>S. ladakanum</i>	Substrat Optimizasyonu	0.73	(Téllez-Luis ve ark., 2004b)
<i>Bacillus circulans</i>	Suş izolasyonu ve Substrat optimizasyonu	0.31	(Souza ve ark., 2006)
<i>S. hygroscopicus</i>	Çevresel kontrol stratejileri	5.79	(Xu ve ark., 2009)
<i>S. ladakanum</i>	Suş izolasyonu	0.35	(Téllez-Luis ve ark., 2004a)
<i>Streptomyces</i> sp.	Suş izolasyonu ve substrat optimizasyonu	1.40	(Macedo ve ark., 2007)

### 2.6.1. Mikroorganizma

Özellikle gıda endüstrisinde ticari olarak mTG enzim üretimi için *Streptomyces* türlerinin önemi bilinmektedir. Bu türler arasında yer alan *Streptomyces mobaraensis* suşları ticari TG üretiminde büyük bir paya sahiptir (Ando ve ark., 1989). Mikrobiyal TG enzim üreticisi mikroorganizmaların belirlenmesi için yapılan diğer çalışmalar ile birlikte üretici kültürler arasında *S. cinnamoneum*, *S. ladakanum*, *S. lividans*, *S. platensis*, *S. sioyaensis*, *S. hygroscopicus*, *Bacillus substilis*, *Pseudomonas putida*, *Zygomonas mobilis* gibi mikroorganizma türleri de dahil olmuştur. Yüksek oranda mTG üreten temel bakteri aileleri arasında *Streptomycetaceae*, *Micrococaceae*, *Bacillaceae* ve *Pseudomonadaceae* aileleri yer almaktadır (Zhu ve ark., 1995; Lin ve ark., 2006; Cui ve ark., 2007; Bourneow ve ark., 2012; Kieliszek ve Misiewicz, 2014).

### 2.6.2. Besiyeri bileşimi

Fermantasyon ortamı mTG üretim maliyetlerinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Besiyeri bileşimi mikroorganizmalar tarafından üretilen TG enzim sentezini etkilemektedir (Souza ve ark., 2006; Kieliszek ve Misiewicz, 2014). Besiyeri kompozisyonunun doğru olarak belirlenmesi gerek maliyetlerin azaltılması gerekse üretim veriminin artırılması bakımından önemlidir. Mikrobiyal TG üretimini etkileyen



besiyeri bileşenlerinin geleneksel yöntemlerle tek tek optimize edilerek belirlenmesi daha basit ve ayrıca değişkenlerin enzim üretimi üzerindeki etkilerinin grafik üzerinde kompleks istatistiksel analizlere ihtiyaç duymadan yorumlamak daha kolaydır (Macedo ve ark., 2007).

*Streptomyces* türlerinden mTG üretiminde kullanılan besiyerlerinin bileşimi çoğunlukla benzer bir bileşime (maya ekstraktı, pepton, sodyum fosfat, potasyum fosfat, magnezyum sülfat ve bir karbon kaynağı) sahiptir. Burada özellikle pepton ve maya ekstraktı gibi bileşenler ekonomik olarak yüksek maliyet oluşturmaktadır (Kieliszek ve Misiewicz, 2014). Kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan karbon ve azot kaynakları mTG verimliliğini etkileyen temel bileşenler arasında yer almaktadır. Pepton, maya ekstraktı, kazein, üre gibi temel bileşenler TG sentezinde kullanılan yaygın azot kaynaklarını oluşturmaktadır. Ayrıca inorganik amonyum tuzları da azot kaynağı olarak kullanılabilen ancak bu tuzların enzim üretimi için daha az kullanışlı oldukları bildirilmektedir. İnorganik azot kaynaklarının ortamda bulunması mikroorganizmaların tarafından sentezi mümkün olmayan aminoasitlere ulaşımını engelleyeceği için mTG sentezinde yapıya katılacak olan elzem aminoasitlerin eksikliğine yol açacaktır. Literatürde yapılan çalışmalarda soya, pirinç, mısır, buğday unu, mısır şurubu ve malt ekstraktı gibi bitkisel kaynakların da enzim üretiminde azot kaynağı olarak besiyerinde kullanılabileceğini önerilmektedir (Kieliszek ve Misiewicz, 2014; Zilda, 2014). Tüm azot kaynakları arasında pepton *Streptomyces* türleri için mTG üretiminde temel azot kaynağını oluşturmaktadır (Zhu ve ark., 1996; Macedo ve ark., 2007). Karbon kaynağı olarak ise özellikle patates nişastası, glukoz ve maltodekstrin gibi bileşenlerin *S. mobaraensis* ile gerçekleştirilen üretimlerde yüksek enzim aktivitesi sağladığı belirtilmektedir (Macedo ve ark., 2007). Ayrıca, yapılan bazı çalışmalarda şeker melası ve gliserol gibi karbon kaynaklarının sinerjistik etki oluşturarak *S. ladakanum* ile gerçekleştirilen mTG üretimini arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmalarda mTG fermantasyonu sırasında şekerlerin (glukoz, fruktoz, sakkoroz) ve gliserolün kültür tarafından farklı oranlarda kullanıldığı belirlenmiştir. Diğer taraftan besiyeri bileşiminde gliserol ve kazeinin birlikte kullanımının da enzim üretimini arttırdığı deneysel olarak belirlenmiştir (Bourneow ve ark., 2012; Téllez-Luis ve ark., 2004b). Bu duruma karşıt bir olgu olarak besiyerindeki peptitlerin veya proteinlerin kendi aralarında mTG tarafından çapraz bağlanma reaksiyonuna maruz kalmaları

sonucunda, bu tür azot kaynaklarının mikroorganizmalar tarafından kullanımının zorlaşacağı gerçeği de ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle ortamda bulunan serbest aminoasitler mTG sentezi ve hücre gelişimi açısından temel sınırlayıcı faktör olmaktadır (Zhu ve ark., 1996; Zhu ve ark., 1998; Bourneow ve ark., 2012).

Bourneow ve ark. (2012), üç bakteri kültürünü (*Enterobacter* sp.C2361, *Providencia* sp. C1112 ve *S. mobaraense* DSM 40847) kullanarak 4 farklı besiyerinde bu kültürlerin mTG üretim miktarlarını incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada mTG enzim üretimi için en uygun olan besiyeri bileşimini %2.0 nişasta, %2.0 pepton, %0.2 maya ekstraktı, %0.2 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %0.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve %0.2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> olarak belirlemişlerdir. Bu besiyerinde *Enterobacter* sp. C2361, *Providencia* sp. C1112 ve *S. mobaraense* DSM 40847 ile gerçekleştirdikleri enzim üretimlerinde sırasıyla 0.87±0.02 (48 saat), 0.82±0.02 (24 saat), 0.85±0.01 (48 saat) Ünite/ml aktivite değerlerine ulaşmışlardır. Temel karbon kaynağı nişasta ile birlikte glukoz içeren farklı bir besiyeri kullanıldığında enzim aktivite değerlerinin ilk besiyerine göre daha düşük gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bu durum sadece glukozun ortamda bulunmasının inhibitör etki yaratarak hem hücre gelişimini hem de mTG üretimini etkilemesi ile açıklanmıştır. Araştırmacılar, temel karbon kaynağı kullanılmadan pepton, maya ekstraktı ve NaCl ile hazırlanan farklı bir besiyerinde gerçekleştirdikleri enzim üretim denemelerinde ise diğer besiyerlerine göre daha düşük mTG aktivite değerlerine ulaşmışlardır. Düşük enzim aktivitesi sonucunu karbon kaynağının olmayışına bağlamışlardır. Ayrıca, azot kaynağı olarak soya proteinleri ve kazeinlerin kullanıldığı bir başka besiyerinde, sadece pepton içeren ilk besiyerinden daha düşük enzim aktivite değerleri (~0.50 Ünite/ml, 48 saat) elde edilmiştir. Bu durum, durgun fazın ortalarına doğru fermantasyonda açığa çıkan amonyum iyonlarının (geri beslemeli inhibisyon) enzim sentezini inhibisyona uğratması ile açıklanabilir (Zhu ve ark., 1996).

Nişasta ve pepton ile yapılan benzer diğer çalışmalarda ise *S. mobaraense* DSMZ 40847 suşu kullanarak 1.80-3.40 Ünite/ml (36-60 saat) enzim aktivitesi değerleri elde edilmiştir (Zhu ve ark., 1996; Zheng ve ark., 2001; Zheng ve ark., 2002b). Zhu ve ark. (1996) karbon kaynağı olarak glukoz yerine sadece nişasta (%2) kullandıkları çalışmada daha yüksek enzim aktivitesi değerlerine ulaşmışlardır. Çalışmada inorganik azot kaynaklarının veya serbest aminoasitlerin besiyerinde azot kaynağı olarak kullanılması

enzim sentezi ve mikrobiyal gelişme için pepton kullanılan besiyerine göre daha iyi düzeyde gerçekleşmiştir.

Iancu ve ark. (2009) *Streptomyces* sp. ile nişastalı besiyeri kullanarak gerçekleştirdikleri mTG üretiminde, 7 günlük inkübasyon sonucunda 0.05-0.20 Ünite/ml aralığında değişen bir enzim aktivitesi değeri elde etmişlerdir. Bahrim ve ark. (2010) ise pepton ve glukoz kullanılarak hazırladıkları besiyerinde 7 günlük inkübasyon sonucunda *Streptomyces* sp. ile 0.43 Ünite/ml değerinde bir enzim aktivitesi belirlemişlerdir.

Macedo ve ark. (2007) topraktan izole ettikleri *Streptomyces* sp. kullanarak en yüksek enzim aktvitesini sağlamak üzere besiyeri bileşenlerinin optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Farklı azot ve karbon kaynaklarının mTG üretimine etkilerini ayrı ayrı inceledikleri bu çalışmada azot kaynağı olarak maya ekstraktı ile birlikte pepton, sadece pepton, sadece mısır şurubu likörü ve sadece kazein kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak ise glukoz ile birlikte patetes nişastası, sadece melas, sadece sakkaroz, sadece maltodekstrin ve sadece çözünür nişasta kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, azot kaynakları içerisinde en yüksek mTG aktivitesine sadece pepton ile hazırlanan besiyerinde (1.12 Ünite/ml), karbon kaynaklarında ise glukoz ve patates nişastası karışımı ile hazırlanan besiyeri (1.12 Ünite/ml) ile sadece maltodekstrin içeren besiyerinde (1.18 Ünite/ml) ulaşılmıştır.

Sorgun asit hidrolizatları ile hazırlanan besiyerinde *S. ladakanum* NRRL-3191 ile gerçekleştirilen mTG üretim denemesinde 72 saatlik inkübasyon sonrasında ortamda 0.34 Ünite/ml değerinde bir aktivite elde edilmiştir (Téllez-Luis ve ark., 2004a). Maya ekstraktı, mısır şurubu likörü ve kazein ilave edilmiş patates hidrolizatı ile hazırlanan besiyerinde yapılan bir başka çalışmada ise 1.13 Ünite/ml mTG aktivite değerine ulaşılmıştır (Guerra-Rodríguez ve Vazquez, 2013).

Téllez-Luis ve ark. (2004b) yaptıkları bir çalışmada karbon kaynağı olarak gliserin (1,2,3-propanotriol ve gliserin) kullandıklarında mTG aktivitesini 250 rpm karıştırma hızında en yüksek 0.72 Ünite/ml olarak belirlemişlerdir.

Ryszka ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada *S. mobaraense* suşunun TG sentezi için en uygun ortamın mısır şurubu likörü ve maya ekstraktı ile hazırlanmış besiyeri (pH 6.5-

7.0) olduğunu göstermişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada enzim aktivitesi değerini 30 saatlik inkübasyon sonrasında 2.0 Ünite/ml olarak ölçmüşlerdir.

Junqua ve ark. (1997) farklı azot kaynaklarının *S. cinnamomeum* suşunun TG enzim üretimine etkisini inceledikleri çalışmada, azot kaynağı olarak kazein ve pepton içeren ortamda elde edilen enzim aktivitesi değerinin (0.33 Ünite/ml) sadece pepton içeren ortama göre üç kat daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Besiyeri bileşiminde sadece gliserol (0.019 Ünite/ml) veya glukoz (0.015 Ünite/ml) kullanıldığında ise çok düşük aktivite değerleri elde etmişlerdir.

Mahmood (2013) buğday kepeği ile hazırlanan katı besiyerini farklı karbon ve azot kaynakları ile zenginleştirerek izole ettiği *Streptomyces* kültürünün mTG enzim üretimine etkisini incelediği çalışmada karbon kaynağı olarak nişasta (1.85 Ünite/g) ve gliserol (1.73 Ünite/g), azot kaynağı olarak ise pepton (1.57 Ünite/g) ve maya ekstraktı (1.42 Ünite/g) ilave edildiğinde kontrol örneğine kıyasla daha yüksek aktivite değerlerine ulaşmıştır. Diğer taraftan kazein, amonyum sülfat, melas, sakkaroz gibi diğer katkıların ilavesi ile enzim aktivitesinde önemli bir artış sağlanamamıştır.

Aidaros ve ark. (2011) kültür ortamında azot kaynağı olarak amonyum sülfat ile birlikte kalsiyum klorür bulunmasının *S. hygroscopicus* WSH03-01 suşunun gelişimini ve mTG üretimini pozitif yönde etkilediğini ve 60 saatlik fermantasyon sonucunda kültürün 3.2 Ünite/ml değerinde bir aktiviteye ulaştığını saptamışlardır.

Zhu ve ark. (1998) *S. mobaraense* (CBS 20778) suşu ile gerçekleştirdikleri enzim üretim çalışmasında hazırladıkları besiyerinde (nişasta, pepton,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $K_2HPO_4$ , maya ekstraktı, bazı aminoasitler) fermantasyon süresince kültür ortamında hücre gelişimini, mTG üretimini,  $CO_2$  oluşumunu, glukoz tüketimini, çözülmüş oksijen (DO) miktarını ve serbest aminoasit miktarlarını ölçmüşlerdir. Fermentörde gerçekleştirdikleri (2.0 litre, pH 6.5) üretimlerde 0.5 v/v/dak hava akış hızı ve kademeli radyal karıştırma (400 rpm-18 saat/ 500 rpm-30 saat) uygulamışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda tüm fermantasyonun 4 farklı fazda (0-12 saat, 12-24 saat, 24-36 saat ve 36-48 saat) gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Buna göre ilk faz olarak kabul edilen fermantasyonun 0-12. saat aralığında biyokütle miktarının, glukoz tüketiminin ve  $CO_2$  miktarının arttığını, DO miktarının ise azaldığını belirlemişlerdir. Mikrobiyal TG

aktivitesi ise ilk fazda çok düşük düzeyde (~0.01 Ünite/ml) ölçmüşlerdir. İkinci fazda (12-24 ssat) biyokütle (6 g/l), CO<sub>2</sub>, DO, glukoz ve aminoasit miktarı çok keskin bir şekilde değişim gösterirken, mTG üretimindeki artış (~0.3 Ünite/ml) düşük düzeylerde gerçekleşmiştir. Üçüncü faz olarak belirlenen fermantasyonun 24-36. saatleri arasında ise hücresel gelişim daha düşük hızlarda artmaya devam ederken ve mTG üretim hızı baskın hale (~1.2 Ünite/ml) gelmiştir. Son fazda (36-48 saat) ise mikrobiyal gelişim, mTG üretimi ve glukoz tüketimi sonlanmıştır. Yapılan bu çalışmada araştırmacılar besiyeri bileşiminde azot ve karbon kaynağı olarak pepton ve nişasta gibi bileşenlerin kullanımının proteaz ve amilaz gibi bazı indükleyici enzimlerin sentezini uyararak daha sonra üretilecek enzimler için öncül bileşiklerin oluşumuna sebep olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca araştırmacılar fermantasyonun son aşamalarında mikroorganizma tarafından üretilen proteinlerden kaynaklanan aminoasit miktarında (1.834 g/l) artış ve serbest aminoasit miktarında ise hafif bir azalma gözlemlemişlerdir. Besiyerinde bulunan proteinlerin, üretilen mTG enzimi ile kendi aralarında çapraz bağlaması sonucu mikroorganizma tarafından etkin bir şekilde kullanılamaması nedeni ile açıklanmıştır.

### 2.6.3. İnkübasyon sıcaklığı ve pH

Yapılan çalışmalarda mTG üretiminde sıcaklığın ve pH'nın önemli bir rol oynadığı ve bu iki faktörün hücre büyümesini ve ürün oluşumunu etkileyen en önemli çevresel parametreler olduğu bildirilmektedir. Sıcaklık ve pH'nın mTG üretimi üzerine etkileri ile ilgili kinetik veriler daha iyi bir fermantasyon sürecinin planlanmasını kolaylaştırmaktadır (Zheng ve ark., 2002a; Yan ve ark., 2005).

Mikroorganizmaların spesifik gelişme hızları sıcaklıktan önemli ölçüde etkilenmektedir. Birçok kinetik model inkübasyon sıcaklığı ile spesifik gelişme arasındaki ilişkiyi açıklamak için öngörülebilir bulunmaktadır. Schoolfield ve ark. (1981) spesifik gelişme hızını sıcaklığın bir fonksiyonu olarak tanımlayan doğrusal olmayan bir Arrhenius modeli önermiştir. Yapılan çalışmalar sıcaklığın mTG fermantasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Buna rağmen, *S. mobaraense* suşlarının hücresel gelişimine ve mTG sentezine inkübasyon sıcaklığının etkileri ile ilgili kinetik modeller hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Zheng ve ark., 2001; Zheng ve ark., 2002b).

Zheng ve ark. (2002b) farklı inkübasyon sıcaklıklarının (25, 28, 30, 32, 33.5 ve 35°C) *S. mobaraense* WSH-Z2 suşunun sıvı besiyerinde (30 g nişasta, 20 g pepton, 2 g maya ekstraktı, 2 g MgSO<sub>4</sub>, 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.5) mTG enzim üretim miktarı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Fermentörde (400-500 rpm, 2.0 v/v/dak hava, 70 saat) gerçekleştirilen mTG enzim üretim denemelerinde kültür ortamının enzim aktivitesi (Ünite/ml) ve hücre kuru ağırlıkları (g/l) takip edilmiştir. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen fermantasyonlarda hücre gelişimleri incelendiğinde, düşük sıcaklıklarda lag fazının uzadığı ancak ortam sıcaklığının artışı (30°C) ile hücre gelişiminin hızlanarak çok kısa sürede maksimum hücre kuru ağırlığına (~25 g/l) ulaşıldığı gözlenmiştir. Araştırmacılar 30°C'nin üstündeki ve altındaki sıcaklık değerlerinde ise daha düşük hücre kuru ağırlığı değerlerine ulaşmışlardır. Sonuç olarak, *S. mobaraense* suşunun spesifik gelişme hızına sıcaklığın büyük bir etkisi olduğunu saptamışlardır. Diğer taraftan yaptıkları çalışmada kültür sıcaklığının artışı ile birlikte mTG sentezinin daha erken evrede başladığını ve 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hücre gelişimi ile aynı anda enzim üretiminin başladığını belirlemişlerdir. Araştırmada en yüksek enzim aktivitesi değerine (2.94 Ünite/ml) 30°C'de gerçekleştirdikleri fermantasyon sonucu ulaşırlarken, düşük sıcaklık değerlerinde mikrobiyal gelişimin durması ile birlikte enzim sentezinin de durduğunu, daha yüksek sıcaklık değerlerinde ise mikrobiyal gelişimin durmasına rağmen 6 saat boyunca enzim üretiminin devam ettiğini bildirmişlerdir.

Zheng ve ark. (2001) iki kademeli sıcaklık artışının *S. mobaraense* WSH-Z2 suşunun mTG üretimine etkisini inceledikleri bir çalışmada farklı fazlarda farklı sıcaklık değerlerini (32°C ve 28°C) kullanmışlardır. Araştırmacılar tüm fermantasyon süresince sabit sıcaklık değerini kullanıldığında hücre gelişimi ve mTG sentezi için gerekli olan optimum sıcaklık değerlerinin birbirinden farklı olduğunu belirlemişlerdir. Bu doğrultuda, fermantasyon sıcaklığını başlangıç fazlarda (gelişim fazı) ilk 18 saat yüksek tutarak (32°C) hücre gelişimi teşvik edilmiş, orta ve son faz aşamasında ise sıcaklık düşürülerek (28°C) hücre gelişim hızı yavaşlatılmış ve mTG sentez hızı arttırılmaya çalışılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda hücre kuru ağırlığında (27.2 g/l) ve mTG aktivitesinde (3.37 Ünite/ml), sabit sıcaklığın (30°C) kullanıldığı fermantasyona göre artış olduğu ve fermantasyon süresinin kısaldığı belirlenmiştir.

Mikrobiyal TG üretiminde inkübasyon sıcaklığı ve pH'sı hücre büyümesi ve ürün oluşumunu etkileyen en önemli çevresel parametrelerdir. *S. mobaraense* WSH-Z2 suşu kullanılarak enzim üretim sürecinde pH değerindeki değişim ile ilgili yapılan bir çalışmada fermantasyonun ilk aşamalarında besiyeri pH değerinin düştüğünü (pH 6.5), daha sonra ise kademeli olarak attığını (pH 7.2) belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlardan besiyeri pH değerinin kültür ortamında fermantasyonun evrelerine bağlı olarak değişim içerisinde olduğunu ve bu durumun mTG enzim üretimine önemli etkisi olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada farklı besiyeri başlangıç pH değerlerinin (pH 5.0-8.5) mTG üretimine etkisi de incelenmiş ve pH 6.5'te en yüksek enzim aktivitesini 48 saatlik inkübasyon sonucunda 2.90 Ünite/ml olarak bulunmuştur. pH 6.0'da gerçekleştirilen enzim üretiminde 1.85 Ünite/ml, pH 7.0'de 2.75 Ünite/ml ve pH 7.5'te 2.20 Ünite/ml enzim aktivitesi değerleri elde edilmiştir. Enzim aktivitesinin artırılması amacıyla, ortam pH'sı fermantasyonun başlarında (ilk 13 saat) pH 7.0'de daha sonra pH 6.5'te sabit tutulmuş ve böylece en yüksek aktivite değerine (3.4 Ünite/ml) ulaşılmıştır. Diğer taraftan pH 5.0 ve pH 8.5 değerlerinde başarılı bir enzim üretimi gerçekleştirilememiştir (Zheng ve ark., 2002a). Benzer şekilde Ryszka ve ark. (2009) *S. mobaraense* suşu ile pH 6.5-7.0'da 2.0 Ünite/ml değerinde enzim aktivitesi elde etmişlerdir.

#### **2.6.4. Karıştırma şeklinin ve hızının etkisi**

Sıvı kültürlerin karıştırılmasında temelde iki farklı karıştırma şekli uygulanabilmektedir. Bunlardan ilki orbital olarak kültür ortamının karıştırıldığı sistemler ikincisi ise ortamının mekanik, konveksiyon, pnömatik veya sürekli gaz fazı sistemleri aracılığı ile karıştırıldığı derin kültür sistemlerdir. Orbital karıştırma sistemleri basit ve ucuz olup, daha ılımlı bir karıştırmanın gerçekleştirilmesine olanak sağlamakla birlikte, kütle (besiyeri bileşenleri ve O<sub>2</sub>) ve ısı transferi açısından zayıf kalabilmektedir (Henzler ve Schedel, 1991). Bu sebeple kontrollü fermantasyon işlemlerinin gerçekleştirildiği biyoreaktörler (fermentör) ısı ve kütle transferinin iyileştirilmesi açısından tercih edilmektedir. Ayrıca fermentörde gerçekleştirilen enzim üretiminin artırılması için geri beslemeli sistemler de kullanılabilir ve böylelikle enzim miktarında ~%80 ve hücre kuru ağırlıklarında ~%30 oranında artış sağlanabilmektedir (Whitaker, 1980; Zhu ve ark., 1998).

Mikrobiyal TG üretiminde besiyeri kompozisyonu ve çevresel şartlar (pH, sıcaklık ve DO) önemli faktörler arasında yer almaktadır. Sıklıkla hücresel gelişim ve enzim üretimi için belirlenen en uygun şartlar birbirinden farklı olabilmektedir. Bu yüzden bu parametrelerin yüksek enzim üretim oranı, yüksek aktivite ve yüksek verimlilik için optimize edilmesi gerekliliğini doğurmaktadır. Özellikle DO miktarı hücresel gelişimi ve enzim üretimini etkileyen en önemli çevresel faktörler arasında yer almaktadır. Fermantasyon esnasında uygulanan karıştırma hızı veya havalandırma oranı, gerek DO miktarını etkilemesi gerekse kütle ve ısı transferine katkı sağlaması açısından önemli bir parametreyi oluşturmaktadır (Yan ve ark., 2005).

Bourneow ve ark. (2012) farklı mikroorganizmalar kullanarak mTG üretimini gerçekleştirdikleri çalışmada (37°C, 36 saat, 150 rpm) ölçek büyütürken (100 ml) enzim aktivite değerlerini küçük ölçekli (5 ml) üretime göre (0.87 Ünite/ml) daha yüksek (0.92 Ünite/ml) olarak belirlemişlerdir. Bu durumu, büyük ölçekli fermantasyonlarda besiyerinin daha fazla çalkalanarak havanın besiyeri ile daha iyi karışmasına bağlamış ve böylelikle hem hücre gelişiminin hem de mTG üretiminin arttığını bildirmişlerdir (Bourneow ve ark., 2012; Portilla-Rivera ve ark., 2009).

*Streptomyces* kültürlerinin çalkalamalı sıvı ortamlarda hızlı hücresel gelişimini sağlamak, homojen dağılmış biyokütle elde etmek ve oksijen transferini arttırmak için türbülans oluşturabilen fiziksel nesnelere ortama eklenmesi klasik bir yaklaşımdır. Çelik yaylar veya çalkalama şişesi başına 20-30 adet cam boncuk bu amaç için kullanılabilir. Daha büyük ölçekli üretimlerde fiziksel nesnelere biyoreaktöre zarar verebileceğinden, yüzey aktif maddeler (surfektan) gibi katkı maddeleri ile besi ortamı desteklenebilmektedir. Bununla birlikte, köpük kırıcı katkıları hücre tarafından tüketilebilir ve DO veya biyokütle miktarını olumsuz etkileyerek fermantasyonu bozabilmektedir. Büyük ölçeklerde hücre gelişimini kontrol etmek için inokülasyon miktarı, pH, sıcaklık ve karıştırma hızı dahil olmak üzere biyoreaktörde kullanılan fiziksel parametreler işlem üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve koşulların optimizasyonu önem arz etmektedir. Bu nedenle, enzim üretimi ile ilgili etkili ve tekrarlanabilir bir yöntem oluşturmak için temel kurallar belirlenmelidir (Rattleff, 2013; Kieser, 2000; Wang ve ark., 2005; Celler ve ark., 2012).



Portilla-Rivera ve ark. (2009) karbon kaynağı olarak şeker kamışı melası (60 g/l) veya gliserol (60 g/l) kullanarak hazırladıkları besiyerlerinde *S. ladakanum* NRRL 3191 suşu ile farklı orbital karıştırma hızlarında (200, 300, 400 rpm) gerçekleştirdikleri fermantasyonlarda (26°C, 120 saat) enzim aktivitesi ve hücre kuru ağırlığı değerlerini belirlemişlerdir. Besiyeri olarak sadece şeker kamışı melası (60 g/l) kullanarak *S. ladakanum* ile gerçekleştirdikleri fermantasyonlarda karıştırma hızının artması ile birlikte biyokütle üretiminin arttığını (maksimum 8.39 g/l, 72 saat) ve bu durumun kültür ortamında O<sub>2</sub> transferinin artmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Farklı karıştırma hızlarının şeker kamışı melasında mTG aktivitesine etkisini incelediklerinde, 200 rpm karıştırma hızlarında 120 saatlik fermantasyon sonunda çok düşük bir aktivite değeri (0.040 Ünite/ml) bulmuşlardır. Diğer taraftan 300 rpm'de 72. saatte 0.170 Ünite/ml ve 400 rpm'de 96. saatte (0.240 Ünite/ml) enzim aktivitesi değerlerini elde edilmiştir. Karbon kaynağı olarak sadece gliserol (60 g/l) kullanarak hazırladıkları besiyerinde gerçekleştirdikleri fermantasyonlarda, melas içeren besiyerindeki sonuçlara benzer olarak karıştırma hızının artmasıyla biyokütle konsantrasyonunun artarak en yüksek değere (10.03 g/l) 400 rpm'de 120 saat sonunda ulaştığını bulmuşlardır. Gliserol ile hazırlanan besiyerinde farklı karıştırma hızlarında gerçekleştirilen fermantasyonlarda mTG aktivitesindeki değişimler incelendiğinde 200 rpm ve 300 rpm karıştırma hızlarında en yüksek değer (~0.240 Ünite/ml) elde edilirken, 400 rpm hızında mTG aktivitesi daha düşük düzeylerde ölçülmüştür. Gliserol ile hazırlanan besiyerinde 400 rpm karıştırma hızlarında 96 saatlik fermantasyon sonucunda 0.170 Ünite/ml enzim aktivitesi değerine ulaşılmıştır. Araştırmacılar gliserol içeren besiyerinde yüksek karıştırma hızında düşük aktiviteye ulaşılmasının sebebini, gliserol içeren besiyerinin yüksek viskozitesinin yanı sıra mTG'nin Na-kazeinat molekülleri arasında çapraz bağlayıcı etkisi sonucu artan strese bağlamışlardır. Yapılan bu çalışma kapsamında ayrıca şeker kamışı melası (30 g/l) ve gliserolün (30 g/l) birebir karışımından hazırlanan besiyerinde 300 rpm karıştırma hızında 72 saatlik fermantasyon ile 0.460 Ünite/ml enzim aktivitesine ulaşmışlardır.

Zhu ve ark. (1998) *Streptoverticillium mobaraense* (CBS 20778) suşu ile sıvı besiyerinde (nişasta, pepton, maya ekstraktı, pH 6.5) kontrollü bir fermentörde (1.0 litre/dak hava, 500 rpm) mTG üretimi için fermantasyonun 20. saatinden sonra geri beslemeli sistem ile farklı aminoasit ve azot kaynakları kullanarak enzim üretimini

gerçekleştirmişlerdir. Geri besleme aşamasında azot kaynağı olarak pepton kullandıkları çalışmada, fermantasyonun ilk 28 saatinde hücre gelişiminin yavaş gerçekleştiğini ve daha sonra artarak 50. saatte hücre kuru ağırlığının 7.5 g/l seviyesine ulaştığını belirlemişlerdir. Bununla birlikte mTG üretiminin ise ilk 30 saatte tamamlandığını ve aktivite değerinin 0.6 Ünite/ml değerine ulaştığını bildirmişlerdir. Azot kaynağı olarak amonyum sülfat kullandıkları geri beslemeli fermantasyon çalışmasında ise hücre kuru ağırlığını 50. saatte 10 g/l, mTG aktivitesini ise 40. saatte 1.8 Ünite/ml olarak bulmuşlardır. Enzim üretimi logaritmik fazın sonlarına doğru gerçekleşerek hızla artmıştır. Amonyum sülfat kullanılan geri beslemeli sistemde fermantasyonun ilk aşamasında (20. saat) DO değerinde önemli bir azalma gözlenmezken 20-30. saatler arasında DO değeri hızlı bir şekilde azalarak %18 seviyesine düştüğü ve daha sonra tekrar artarak %20 değerine ulaştığı belirlenmiştir.

Zheng ve ark. (2001), nişasta, pepton ve maya ekstraktı ile hazırladıkları besiyerinde (pH 6.5) kontrollü fermantasyon şartlarında (400-500 rpm, 1.3 v/v/dak hava) *Streptoverticillium mobaraense* WSH-Z2 suşu ile farklı sıcaklıklarda (25-35°C) fermentörde gerçekleştirdikleri mTG üretimlerinde en yüksek aktivite ve hücre kuru ağırlığı değerlerini 30°C'de sırası ile 2.94 Ünite/ml ve 25.1 g/l olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar, ayrıca hücre kuru ağırlığı ve mTG aktivitesindeki artışın birbirine paralel olarak gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Yan ve ark. (2005) *S. mobaraense* WSH-Z2 suşu ile farklı hacimlerde (30-140 ml) besiyeri kullanarak çalkalamalı inkübatörde (200 rpm) gerçekleştirdikleri mTG üretimlerinde besiyeri hacminin hücre gelişimi ve mTG üretimine etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada artan besiyeri hacminin hücre kuru ağırlığına (~22 g/l) önemli bir etkisinin olmadığını ancak mTG miktarına etkisinin olduğunu bulmuşlardır. Hacim artışı ile birlikte DO konsantrasyonundaki değişime bağlı olarak mTG aktivitesinin 100 ml'lik besiyeri hacminde en yüksek değerine (1.87 Ünite/ml) ulaştığını daha yüksek hacimlerde ise azaldığını belirlemişlerdir. Kontrollü fermantasyon amacıyla fermentörde farklı karıştırma hızlarında (250, 350, 450 rpm) ve kontrollü şartlarda (1 v/v/dak hava, 30°C, pH 6.7-7.2) gerçekleştirdikleri mTG üretimlerinde fermantasyon süresince besiyerindeki DO miktarının ilk evrede hızlı bir şekilde azaldığı ve son evrede stabil kaldığını gözlemlemişlerdir. Bu durum ilk evrede hücrelerin

oksijen tüketim hızlarının oksijen transfer hızından daha yüksek olması ve daha sonra dengeye ulaşılması ile ilişkilendirilmiştir. Karıştırma hızının artması ile DO miktarındaki artışa bağlı olarak hücreler hızlı bir gelişme göstermiş (kısa lag fazı) ve 450 rpm karıştırma hızında biyokütle miktarında (31.8 g/l, 30 saat) önemli bir artış sağlanmıştır. Diğer taraftan mTG aktiviteleri incelendiğinde, 350 rpm karıştırma hızında inkübasyonun 40. saatinde en yüksek aktivite değerine (2.88 Ünite/ml) ulaşılrken, 450 rpm karıştırma hızında aktivitede düşüş gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, yüksek DO değerlerinin hücre gelişimini daha iyi teşvik ettiğini fakat mTG üretimi için uygun olmadığını belirlemiştir. Fermantasyon proseslerinde karıştırma hızının farklı türbülans ve kesme kuvvetleri oluşturarak hem hücre gelişimini hem de enzim üretimini etkilediği bilinmektedir. Ayrıca araştırmacılar sabit karıştırma hızında (350 rpm) hava akış hızlarını değiştirerek (0.75-2.0 v/v/dak) iki kademeli DO kontrol stratejisi ile mTG üretimini arttırmaya yönelik yaptıkları çalışmada, hücre kuru ağırlığını 31.5 g/l, mTG aktivitesini ise 3.32 Ünite/ml olarak belirlemişler ve enzim aktivitesinde ~%15'lik bir artış sağlamışlardır.

### **2.6.5. Mikrobiyal stres faktörleri**

Stres aracılı bir biyoproses biyolojik hedef verimliliğini arttırmak için tasarlanmış bir diğer stratejidir. Besiyeri bileşiminde bulunan karbon, azot veya fosfat gibi kaynakların tükenmesi ile hücre gelişimi kısıtlanır ve bu sayede ikincil metabolitlerin üretimi sağlanabilir. Stres faktörleri göz önünde bulundurularak oluşturulan fermantasyon sistemleri ile istenen metabolitin üretimi artırılabilir. Stres faktörleri arasında, ısıl şok bakteriler gibi biyolojik hücreler için hassas ve yararlı bir uyarıcıdır. Sıcaklık, tuz, alkol ve pH ikincil metabolit üretimini etkileyen önemli beslenme dışı stres faktörlerindedir. Mikrobiyal TG gibi ikincil metabolit olan antibiyotikler üzerine yapılmış çalışmalarda ısıl şok, alkol ve tuz uygulaması gibi stres faktörlerinin üretimi olumlu yönde etkilediği görülmüştür (Rigali ve ark., 2008).

*Bacillus* cinsine ait bakteri türleri besinsel yokluk, sıcaklık ve nem değişiklikleri, oksidatif stres, tuz konsantrasyonunda ani yükselme gibi ani olumsuz çevresel değişikliklere karşı korunmak için oldukça karmaşık düzenleyici sistemler geliştirmişlerdir. *Bacillus subtilis* spor oluşturarak, degradatif enzim ve/veya genel stres

proteinleri sentezleyerek çevresel stres faktörlerine karşı cevap verebilmektedir. Bir toprak bakterisi olan *B. Subtilis* özellikle tuz stresine karşı adaptasyon mekanizmaları geliştirmiştir. Bu düzenleyici mekanizmalar çok sayıda genin ifadesinde meydana gelen değişimleri içermektedir. *B. subtilis* için en az üç ayrı tuz stres uyarım mekanizması bildirilmiştir (Gabdrakhmanova ve ark., 2005).

Stres ortamı genellikle bakteriyel hücrelerin potansiyel davranışını açığa çıkarabilir. Özellikle ısı şoklarının iyi bir uyarıcı olduğu bilinmektedir. Bazı bakterilerde var olduğu bilinen ısı şok proteinlerinin, proteinlerin yeniden katlanma ve translokasyonunda önemli rolleri olduğu tanımlanmıştır. Reaktif oksijen türleri tarafından indüklenen oksidatif stres de kapsamlı olarak incelenmiştir. Hidrojen peroksitinin, antijen reseptöründeki sinyalleme başlatılmasında ve çoğaltılmasında ikincil haberci olarak önemli roller oynayabileceği bildirilmiştir (Ngo ve ark., 2009).

Isı şok stresinin, *E. coli* hücrelerinde sitoplazmik  $\beta$ -galaktosidaz enziminin üretimini artırabildiği bildirilmiştir (Umakoshi ve ark., 1998). Doull ve ark. (1994) poliketid bir antibiyotik olan Jadomisin b sentezinin ısı şok veya etanol uygulaması ile tetiklendiğini belirtmişlerdir. Nakata ve ark. (1999)'nın *Pseudomonas fluorescens* s272'nin stres faktörleri varlığında antibiyotik üretimini inceledikleri çalışmada, ortama sürekli etanol eklendiğinde yüksek tuz konsantrasyonu içeren besiyerinde ve ısı şoklarda antibiyotik üretiminin stres faktörü olmayan ortama göre daha yüksek olduğunu tespit edilmiştir. Himabindu ve ark. (2007) gentamisin üretiminde fermantasyon sırasında ısı şok ile yüksek tuz ve etanol konsantrasyonu gibi stres faktörlerinin olumlu etki ettiğini belirlemişlerdir.

## **2.7. Enzim Saflaştırma Teknikleri**

Enzimlerin saflık dereceleri kullanım alanına bağlı olarak farklı derecelerde olabilmektedir. Enzimlerin sahip olduğu birçok fonksiyonel özellik ve özgüllük enzimlerin doğal formlarından kaynaklanmaktadır. Bu yapısal karakter pH, sıcaklık, iyonik şiddet gibi birçok faktörden etkilenebilmektedir. Bu doğal yapının korunması için izolasyon ve saflaştırma basamaklarında enzim yapısını koruyacak ılımlı ve özel yöntemler seçilmelidir. Enzimin ileri düzeyde saflaştırılabilmesi için ilk olarak hücre

parçalama, filtrasyon, santrifüjleme, tuz ile çöktürme ve diyaliz işlemlerinin uygulanması gerekmektedir. Daha ileri düzeyde saflaştırmayı sağlayabilmek için ise bahsedilen işlem basamaklarından sonra kromatografik tekniklerin (jel filtrasyon, iyon değiştirme, adsorpsiyon, affinite vb.) kullanılması daha saf enzim üretimine olanak sağlamaktadır (Ekren, 2013).

Nötral tuzların ilavesiyle presipitasyon, proteinlerin fraksiyonlanarak çöktürülmesinde en çok kullanılan yöntemdir. Bu şekilde çöktürülen protein genellikle denatürasyona uğramadığından, aktivite peletin geri çözülmesi ile geri kazanılır. Protein çözeltisine çok miktarda nötral tuz ilave edildiğinde, proteinlerin genellikle iç kısımlarında yer alan hidrofobik gruplar etrafındaki su molekülleri tuz iyonları tarafından uzaklaştırılır. Bu durumda hidrofobik grupların birbirleri ile olan etkileşimleri artar ve proteinler çöker. Çöktürme işleminde birçok avantajı nedeniyle en fazla kullanılan tuz, amonyum sülfattır ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Amonyum sülfat proteinlerin denatürasyon, proteoliz ve bakteriyel kontaminasyona karşı kararlılığını korur. Ayrıca, amonyum sülfatın çözünürlüğü sıcaklıkla çok az değişir (0-30°C) ve büyük miktarlarda ucuz bir şekilde saf olarak temin edilebilir (Metin, 2007).

Aseton, etanol, metanol gibi organik çözücüler proteinlerin çözünürlüğünü azaltarak çökmelerine yol açarlar. 10°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda denatürasyona hızlanacağı için işlem genellikle soğukta (0-4°C) gerçekleştirilir (Cui ve ark., 2007). Gıda endüstrisinde proteinlerin çöktürülmesi işleminde genellikle etanol kullanılır (Donnelly, 1987). Etanol kimyasal bağların oluşumu sırasında suyla rekabet ederek proteinlerin su tutma kapasitesini ve ortamın su aktivitesini (a<sub>w</sub>) değiştirebilir (Lerici ve Manzocco, 2000). Sonuç olarak, etanol varlığında enzim veya substrat proteininin konformasyonel yapısında değişimi meydana gelebilir. Dolayısıyla, etanolün mTG etkinliği üzerindeki etkisi önemli karakterizasyondan biridir ve gıda endüstrisinde uygulanması için yararlıdır.

Mikrobiyal fitaz enziminin besiyerinden farklı amonyum sülfat doygunluklarında çöktürülmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, %40 doygunlukta saflaştırma katsayısı 0.048 ve verim %0.48; %60 doygunlukta 0.14 ve %0.5; %80 doygunlukta 0.39 ve %3.8; %95 doygunlukta 1.6 ve %34 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada kromatografik

saflaştırma basamağında ise saflaştırma katsayısı 73 ve verim ise %2.6 olarak belirlenmiştir (Ekren, 2013).

Ho ve ark. (2000) *S. ladakanum* ATCC 27441 suşu ile 150 rpm çalkalamalı inkübatörde üretmiş oldukları mTG enziminin saflaştırılmasında ilk olarak besiyeri membran filtreden (0.22 µm) geçirilmiş, daha sonra 24 saat boyunca sodyum asetat tamponunda (50 mM, pH 5.5) diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Diyaliz edilen örnek (filtrat) kromatografik olarak önce CM Sepharose CL-6B kolon kullanılarak, daha sonra ise Blue Sepharose Fast Flow kolon kullanılarak kademeli ve lineer gradient elüsyon metotları ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan örnekler son olarak ultrafiltrasyon (Amicon) tüplerinde konsantre edilmiştir. Araştırmacılar lineer gradient metodunu kullanarak kromatografide gerçekleştirdikleri saflaştırma işlemleri sonucunda saflaştırma katsayısını 14.4, verimi %68.4 ve spesifik aktivite değerini 21.7 Ünite/mg olarak belirlemişlerdir. Kademeli elüsyon metodu ile gerçekleştirdikleri saflaştırma işleminde ise saflaştırma katsayısını 13.6, verimi %81 ve spesifik aktiviteyi 32.7 Ünite/mg değerlerinde elde etmişlerdir.

Cui ve ark. (2007) *S. hygroscopicus* WSH03-13 suşundan ürettikleri mTG enziminin besiyerinden saflaştırılması aşamasında etanol presipitasyonu ve kromatografik yöntemleri kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada alkol ile çöktürme işleminde filtre edilmiş besiyeri içerisine (%2 w/v protein) son etanol konsantrasyonu %70 (v/v) olacak şekilde soğuk alkol ilave ederek bir gece +4°C'de bekletmişler ve 10000 g'de 20 dakika santrifüj uygulayarak elde ettikleri kısmi saf enzim çözeltisini bir gece diyaliz işlemine tabi tutmuşlardır. Kromatografik saflaştırma aşamasında ise kısmi saf enzim çözeltisi sırasıyla CM-selüloz ve Saphadex G-75 kolonları kullanılarak safsızlık unsurlarından arındırılmıştır. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada enzim üretimini gerçekleştirdikleri besiyerinde (0.25 Ünite/mg protein) proteinlerin alkol ile çöktürülmesi aşamasında mTG enzimi için yaklaşık %85 verim ve 2 katlık bir saflaştırma etkinliği elde etmişlerdir. Kromatografik saflaştırma basamaklarında ise CM-selüloz kolonunda verimi %57.7 ve saflaştırma katsayısını 25 olarak, Sephadex G-75 kolonunda ise verimi %21.1 ve saflaştırma katsayısını 30 olarak elde etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada kromatografik saflaştırma basamaklarının özellikle kısmi saflaştırılmış enzim

zeltelerinde mTG enzimi dışındaki diğer protein safsızlıklarının elemine edilmesinde etkin bir yöntem olduğu bildirilmiştir.

Topraktan izole ettikleri *Streptoverticillium* S-8112 suşunu kullanarak sıvı besiyerinde mTG enzim üretimini gerçekleştiren Ando ve ark. (1989) ultrafiltrasyon tekniği kullanarak konsantre ettikleri sıvıda %92 verim elde ederlerken, kromatografik tekniklerde ise en yüksek %73 verim değerine ulaşabilmişlerdir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Mikrobiyal transglutaminaz (mTG) enzim üretimi amacı ile üretici türler arasında yer alan *Streptomyces mobaraensis* NRRL B-3729, *Streptomyces ladakanum* NRRL ISP-5587, *Streptomyces lividans* NRRL B-12275, *Streptomyces sioyaensis* NRRL B-5408, *Streptomyces platensis* NRRL B-5486 ve *Streptomyces hygrosopicus* ISP-5578 bakteri türleri Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA), Tarımsal Araştırma Merkezi'nden (ARS) liyofilize kuru toz formda temin edilmiştir. Transglutaminaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak kullanılan N-Benziloksikarbonil-L-Glutaminglisin (Z-Gln-Gly) peptidi ise Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Diğer kimyasallar (hidroksilamin, FeCl<sub>3</sub>, glutation, L-glutamik asit,  $\gamma$ -monohidroksimat) ve besiyeri bileşenleri ise çeşitli firmalardan (Sigma, Merck) temin edilmiştir.

Mikroorganizmanın aktifleştirilmesi, enzim üretimi, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. *Streptomyces* türlerinin aktifleştirilmesi, saflık kontrolleri ve muhafazaları

Liyofilize olarak laboratuvara getirilen bakteri kültürlerinin canlandırılması ve aktifleştirilmesi amacı ile DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH) kataloğunda belirtilen prosedür doğrultusunda kültürlerin aktifleştirilme işlemleri, 4 g/l glukoz, 4 g/l maya ekstraktı, 10 g/l malt ekstraktı bileşime sahip pH 7.2'ye (WTW İmolab pH7110) ayarlanmış "GYM *Streptomyces* sıvı besiyeri" kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2017). Besiyerinin sterilizasyon işlemleri ise otoklavda (HMC hv-851) 121°C'de (15 dak) yapılmıştır. Ekim kabini içerisinde (Esco classic 2 BSC, Singapur) aseptik şartlarda liyofilize bakteri kültürlerinin bulunduğu cam tüpler kırılarak GYM *Streptomyces* sıvı besiyerine aktarılmış ve 30°C'de 24 saat



boyunca aktifleşmeleri için statik inkübasyona (Binder BD-53, Almanya) bırakılmışlardır. Daha sonra bulanıklık ve misel yapılar oluşan tüplerden 1 ml alınarak tekrar aynı steril sıvı besiyerine inokülasyonları gerçekleştirilmiş ve çalkalamalı inkübatörde (30°C, 200 rpm) (Edmund Bühler GmbH KS-15, TH-15, Almanya) geliştirilen mikroorganizmaların adaptasyonu sağlanmıştır. Bu işlemler her 5 günde bir tekrar edilerek çalışmalarda kullanılmak üzere aktif bakteri kültürlerinin sürekli olarak muhafazası sağlanmıştır.

Aktifleştirilen kültürlerin saflık kontrollerinin yapılması amacı ile DSMZ besiyeri kataloğunda belirtilen “GYM *Streptomyces* Katı Besiyeri” (0.8 g/l glukoz, 2 g/l maya ekstraktı, 0.8 g/l malt ekstraktı, 0.4 g/l CaCO<sub>3</sub>, 2.4 g/l agar; pH 7.2) kullanılmıştır. Aktifleştirilmiş GYM sıvı besiyerindeki bakteri kültürlerinden öze yardımı ile petrilere sürme plak yöntemiyle ekilen kültürler 30°C’de yaklaşık 72 saat koloni oluşumu gözlemlenene kadar inkübasyona bırakılmıştır. Katı besiyerinde geliştirilen *Streptomyces* türlerinin hücre morfolojileri mikroskop altında incelenmek üzere, katı besiyerindeki *Streptomyces* kolonilerinden öze ile alınmış, saf su ile seyreltilerek lam üzerine yayıldıktan sonra, üzeri lamel ile kapatılarak mikroskopta (Leica-objektif, 100x) hücre morfolojileri gözlenmiştir (Halkman, 2005).

Bakteri kültürlerinin Gram reaksiyonlarını belirlemek üzere GYM besiyerinde aktifleştirilmiş tüm *Streptomyces* suşlarına Gram boyama işlemi uygulanmıştır. Gram boyama setinin (Merck, Germany) üzerinde belirtilen talimatlar doğrultusunda boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Gram boyama testinde 18-24 saatlik taze kültürlerden aseptik koşullarda bir öze dolusu lam üzerine alınarak damıtık su ile seyreltilmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler bek alevinden geçirilerek fikse edildikten sonra boyama işlemine geçilmiştir. Boyama işleminde hazırlanan preparatın üzerine ilk olarak kristal viyole çözeltisi damlatılarak 1 dakika ve sonrasında lugol çözeltisi damlatılarak 1 dakika bekletilmiştir. Bu işlemler sonrası 5 saniye damıtık su ile yıkanan preparat renk giderme amacı ile üzerine etil alkol (%96, Teksol) damlatılarak 15-30 s bekletilmiştir. Damıtık su ile tekrar 5 s yıkanan örneğin üzerine karşıt boya olan safranin damlatılmış (40-45 s) ve su ile yıkanan örnekler oda sıcaklığında havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatların üzerine immersiyon yağı damlatılarak

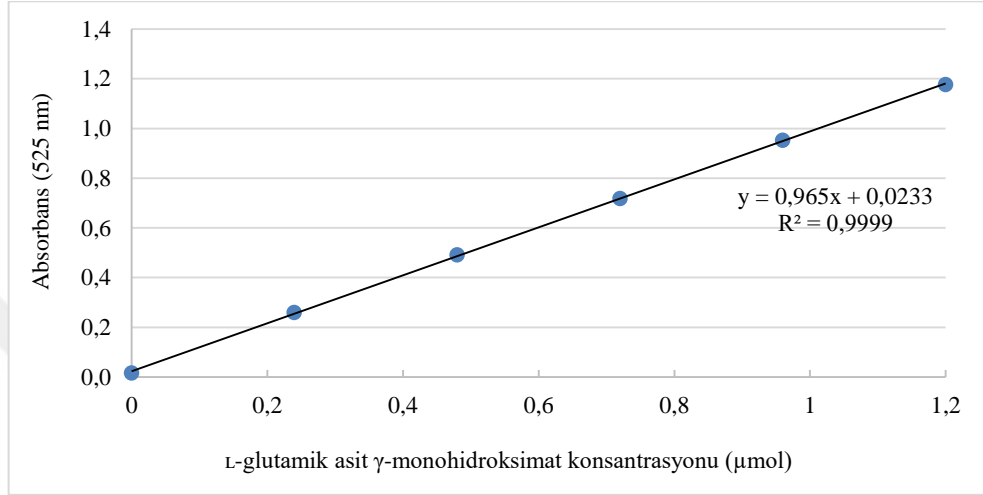
100X objektifte mikroskop altında kültürlerin Gram reaksiyonları belirlenmiştir (Halkman, 2005).

Bakteri kültürlerinin muhafazası amacı ile GYM katı besiyerine sürme plak yöntemiyle oluşturulan tek kolonilerden öze ile alınarak 30 ml'lik GYM sıvı besiyerine aktarılmış ve 30°C'de 2-4 gün inkübe edildikten sonra gelişen aktif kültürler 6000 rpm'de 7 dakika santrifüjlenmiştir (Hettich EBA 21, Almanya). Elde edilen bakteri çökeltileri üzerine belirli miktarda steril GYM sıvı besiyeri ilave edilmiş ve böylece konsantrasyon bakterisi süspansiyonları hazırlanmıştır. Toplam hacmin %30'u (v/v) gliserol olacak şekilde, bakteri süspansiyonuna steril koşullarda gliserol ilave edilerek, 1 ml'lik kriyotüplere süspansiyonlar dağıtılmıştır. Kültürlerin uzun süreli muhafazası amacı ile hazırlanan stok kültürler -65°C'de (Thermo Electron ULT) depolanmıştır (Lages ve ark., 1999).

### **3.2.2. Mikrobiyal TG enzim aktivitesinin belirlenmesi**

Transglutaminaz enzim aktivitesi, enzimin spesifik bir substratı olan Z-Gln-Gly peptidi ve hidroksilamin arasındaki reaksiyon sonucu oluşan hidroksimat miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanan hidroksimat metodu kullanılarak belirlenmiştir (Folk ve Cole, 1965). Bu amaçla, 100 µl enzim çözeltisi üzerine 200 µl 200 mM Tris-HCl (pH 6.0), 25 µl 12.5 mM glutation, 25 µl 125 mM hidroksilamin ve 75 µl 37.5 mM Z-Gln-Gly çözeltileri sırasıyla eklenmiş ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda enzimatif reaksiyonun durdurulması ve renk oluşumu için reaksiyon ortamına 425 µl (%15 TCA- %5 FeCl<sub>3</sub>) çözeltisi ilave edilmiş ve 11000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Hettich Micro 200, Almanya) işlemi uygulanan örneklerin üst fazlarının spektrofotometrede (Perkin-Elmer Lambda EZ 201, ABD) 525 nm'deki absorpsiyonları belirlenmiştir. Enzim aktivitesi ölçümünde standart kurvenin (Şekil 3.1) oluşturulmasında; hazırlanan standart çözelti (0-1.20 µmol L-glutamik asit γ-monohidroksimat) dilüsyonlarına standart enzim aktivitesi belirleme prosedürü uygulanarak, spektrofotometrede 525 nm'de absorpsiyon değerleri okunmuştur. Hazırlanan L-glutamik asit γ-monohidroksimat konsantrasyonlarına karşılık gelen absorpsiyonların grafiğinden elde edilen doğrunun denklemi ile analize alınan örneklerdeki L-glutamik asit γ-monohidroksimat (µmol) miktarı belirlenmiştir. TG enziminin Ünitesi (U); reaksiyon ortamında (pH 6.0) 37°C'de 1 dakikada 1.0 µmol

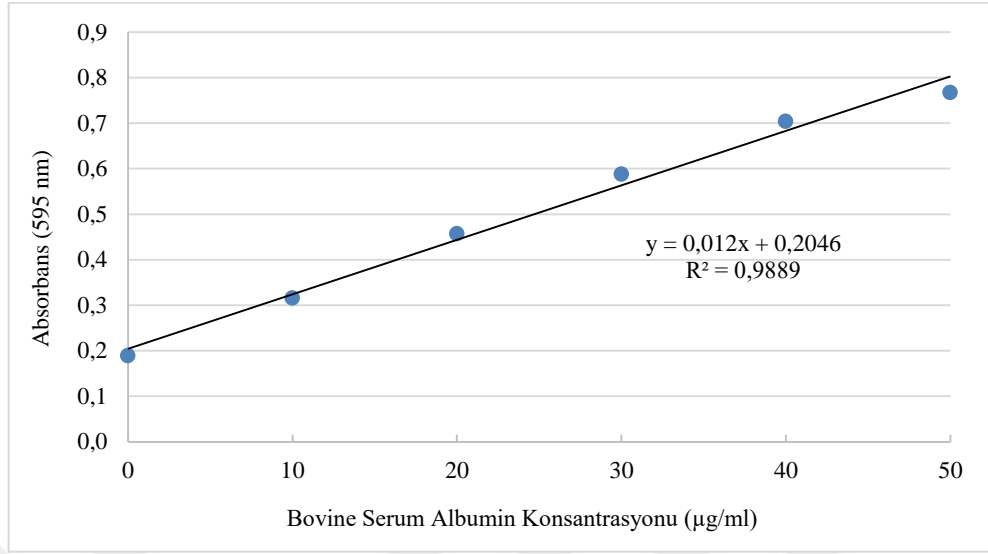
hidroksimat açığa çıkaran enzimin miktarı olarak tanımlanmıştır (Bourneow ve ark., 2012; Estevinho ve ark., 2013). Enzim aktivitesinin belirlenmesinde substratlar ve enzim için uygun şahit çözeltiler kullanılmış ve enzim aktivitesi Ünite/ml (U/ml) enzim çözeltisi olarak hesap edilmiştir.



Şekil 3.1. L-glutamik asit γ-monohidroksimat için standart kurve grafiği

### 3.2.3. Toplam protein miktarının ve mTG enziminin spesifik aktivitesinin belirlenmesi

Spesifik enzim aktivitesinin ve saflaştırma basamaklarındaki protein geri kazanım oranlarının belirlenebilmesi amacı ile sıvı örneklerdeki protein miktarı, modifiye edilmiş Bradford (1976) protein tayin yöntemine göre ölçülmüştür. Bradford boya çözeltisinin hazırlanması için; 50 mg Brilliant blue G-250 tartılarak 50 ml saf metanol içerisinde çözüldürülmüş ve sonra üzerine 100 ml %85'lik (w/v)  $H_3PO_4$  ilave edilerek karışım saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan Bradford boya çözeltisi  $+4^{\circ}C$ 'de karanlık bir ortamda depolanarak, analiz sırasında filtre kağıdı (Whatman No:1) ile süzülerek kullanılmıştır. Örneklerde protein miktarının belirlenmesi aşamasında 300 µl enzim çözeltisi alınarak 700 µl Bradford boya çözeltisi ile vortekste karıştırılmış, spektrofotometrede 595 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Standart kurvenin oluşturulmasında, Bovine Serum Albumin (BSA) stok çözeltisinden (0.1 g/100 ml) farklı konsantrasyon aralıklarında (0-50 µg/ml) hazırlanan dilüsyonlar kullanılmıştır. BSA standart grafiğinden elde edilen denklem ile örneklerdeki protein içeriği hesaplanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Bovine Serum Albumin (BSA) için standart kurve grafiği

Protein miktarı belirlenen örneklerin, spesifik enzim aktivitesinin (U/g protein) hesaplanmasında ise Eşitlik 3.1 kullanılmıştır (Zhang ve ark., 2012a).

$$\text{Spesifik enzim aktivitesi (U/g protein)} = \frac{\text{Enzim aktivitesi (U/ml)}}{\text{Protein miktarı (g protein/ml)}} \quad (3.1)$$

### 3.2.4. Kültür ortamında biyokütle ağırlığının belirlenmesi

Mikrobiyal TG üretimlerinde fermantasyon ortamında gelişen hücrelerin ve oluşan misellerin kuru ağırlığının belirlenmesi amacıyla, fermantasyon ortamından alınan sıvı besiyeri örnekleri (1 ml), darası alınmış Ependorf tüpleri (G1) içerisine konarak 11000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve sıvı faz uzaklaştırıldıktan sonra çökelti 1 ml saf su ile yıkanarak tekrar santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Yıkama işlemi iki kez tekrarlandıktan sonra sıvı faz uzaklaştırılarak, hücre çökeltilerini içeren tüpler 105°C'de sabit tartıma gelene kadar etüvde (Mettler M100-800, Almanya) kurutulmuş ve tartılmıştır (G2). Fermantasyon sıvısındaki biyokütle miktarı Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır (Zhu ve ark., 1996; Zheng ve ark., 2002a; Zhang ve ark., 2012b; Zhang ve ark., 2012c).

### 3.2.5. İnkübasyon sıcaklığı, besiyeri bileşimi ve başlangıç pH değerinin enzim üretimine etkisinin belirlenmesi

Mikrobiyal TG enzim üreticisi olarak seçilen kültürlerin enzim aktivitesine besiyeri bileşiminin (karbon ve azot), farklı inkübasyon sıcaklıklarının (20, 30, 40°C), farklı besiyeri başlangıç pH değerlerinin (pH 6.0, 7.0, 8.0) etkilerinin belirlenmesi amacı ile maksimum enzim aktivitesinin elde edildiği besiyeri, sıcaklık ve pH şartları belirlenmiştir (Bahrim ve ark., 2010; Bourneow ve ark., 2012). En yüksek enzim aktivitesinin elde edilmesi amacı ile üretim koşulları (besiyeri başlangıç pH'sı, inkübasyon sıcaklığı) ve besiyeri bileşenleri değiştirilerek üç farklı bakteri kültürü (*S. ladakanum*, *S. mobaraensis*, *S. lividans*) ile hazırlanan deneme planı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Enzim üretiminin artırılması için hazırlanan deneme planı

Deneme No	Kültür	Sıcaklık (°C)	pH	Besiyeri	Deneme No	Kültür	Sıcaklık (°C)	pH	Besiyeri
1	<i>S. ladakanum</i>	20	6	GNB	28	<i>S. mobaraensis</i>	30	6	MIX
2	<i>S. ladakanum</i>	20	7	GNB	29	<i>S. mobaraensis</i>	30	7	MIX
3	<i>S. ladakanum</i>	20	8	GNB	30	<i>S. mobaraensis</i>	30	8	MIX
4	<i>S. ladakanum</i>	20	6	MIX	31	<i>S. lividans</i>	30	6	GNB
5	<i>S. ladakanum</i>	20	7	MIX	32	<i>S. lividans</i>	30	7	GNB
6	<i>S. ladakanum</i>	20	8	MIX	33	<i>S. lividans</i>	30	8	GNB
7	<i>S. mobaraensis</i>	20	6	GNB	34	<i>S. lividans</i>	30	6	MIX
8	<i>S. mobaraensis</i>	20	7	GNB	35	<i>S. lividans</i>	30	7	MIX
9	<i>S. mobaraensis</i>	20	8	GNB	36	<i>S. lividans</i>	30	8	MIX
10	<i>S. mobaraensis</i>	20	6	MIX	37	<i>S. ladakanum</i>	40	6	GNB
11	<i>S. mobaraensis</i>	20	7	MIX	38	<i>S. ladakanum</i>	40	7	GNB
12	<i>S. mobaraensis</i>	20	8	MIX	39	<i>S. ladakanum</i>	40	8	GNB
13	<i>S. lividans</i>	20	6	GNB	40	<i>S. ladakanum</i>	40	6	MIX
14	<i>S. lividans</i>	20	7	GNB	41	<i>S. ladakanum</i>	40	7	MIX
15	<i>S. lividans</i>	20	8	GNB	42	<i>S. ladakanum</i>	40	8	MIX
16	<i>S. lividans</i>	20	6	MIX	43	<i>S. mobaraensis</i>	40	6	GNB
17	<i>S. lividans</i>	20	7	MIX	44	<i>S. mobaraensis</i>	40	7	GNB
18	<i>S. lividans</i>	20	8	MIX	45	<i>S. mobaraensis</i>	40	8	GNB
19	<i>S. ladakanum</i>	30	6	GNB	46	<i>S. mobaraensis</i>	40	6	MIX
20	<i>S. ladakanum</i>	30	7	GNB	47	<i>S. mobaraensis</i>	40	7	MIX
21	<i>S. ladakanum</i>	30	8	GNB	48	<i>S. mobaraensis</i>	40	8	MIX
22	<i>S. ladakanum</i>	30	6	MIX	49	<i>S. lividans</i>	40	6	GNB
23	<i>S. ladakanum</i>	30	7	MIX	50	<i>S. lividans</i>	40	7	GNB
24	<i>S. ladakanum</i>	30	8	MIX	51	<i>S. lividans</i>	40	8	GNB
25	<i>S. mobaraensis</i>	30	6	GNB	52	<i>S. lividans</i>	40	6	MIX
26	<i>S. mobaraensis</i>	30	7	GNB	53	<i>S. lividans</i>	40	7	MIX
27	<i>S. mobaraensis</i>	30	8	GNB	54	<i>S. lividans</i>	40	8	MIX

GNB: Glukoz-Nişasta bazlı besiyeri, MIX: Glukoz-Nişasta-Soya bazlı besiyeri

Enzim üretiminin arttırılması amacı ile, kullanılan iki farklı besiyeri (GNB ve MIX) belirtilen başlangıç pH değerlerine (pH 6.0, 7.0 ve 8.0) ayarlandıktan sonra 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek *S. ladakanum*, *S. mobaraensis* ve *S. lividans* aktif kültürleri ile %1 oranında inoküle edilmiş ve farklı sıcaklıklarda (20, 30 ve 40°C) klasik (statik) inkübatörde 30 ml’lik tüpler içerisinde iki tekerrürlü olarak 28 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Macedo ve ark., 2007; Cui ve ark., 2007). İnkübasyon süresince belirli zaman aralıklarında steril olarak besiyerlerinden örnek alınmış ve hidroksimat metodu ile enzim aktiviteleri (U/ml) belirlenmiş ve protein miktarları üzerinden de spesifik aktiviteleri (U/g protein) hesaplanmıştır. Kullanılan GNB ve MIX besiyerlerinin bileşimleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. GNB ve MIX sıvı besiyeri bileşimleri

GNB sıvı besiyeri (Macedo ve ark., 2007)		MIX sıvı besiyeri (Cui ve ark., 2007)	
Bileşen	Miktar (% , w/v)	Bileşen	Miktar (% , w/v)
Nişasta	1.5	Nişasta	0.5
Glukoz	5.0	Glukoz	0.5
Pepton	1.5	Gliserol	1.0
Maya ekstraktı	0.4	Pepton	1.5
MgSO <sub>4</sub>	0.2	Soya unu	2.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2	Maya ekstraktı	0.5
		MgSO <sub>4</sub>	0.2
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
		CaCO <sub>3</sub>	0.5

### 3.2.6. Çalkalamalı (orbital) inkübasyonun enzim üretimine etkisinin belirlenmesi

En yüksek enzim aktivitesine ulaşılan üretim şartlarında (pH, sıcaklık, besiyeri) *S. mobaraensis* kültürü ile enzim aktivitesinde artış sağlanması ve enzim üretimine çalkalama işleminin etkisinin incelenmesi amacıyla, başlangıç pH’sı 6.0 olacak şekilde hazırlanan 100 ml’lik steril GNB besiyerine %1 (v/v) oranında, GYM besiyerinde (pH 7.2) 48 saat süresince aktiveleştirilmiş *S. mobaraensis* kültürü inoküle edilerek çalkalamalı inkübatörde iki tekerrürlü olarak 100, 150 ve 200 rpm karıştırma hızlarında enzim üretimleri gerçekleştirilmiştir. 250 ml’lik erlen içerisinde 30°C’de 10 gün boyunca gerçekleştirilen inkübasyonlarda her 2 günde bir steril ortamda besiyerinden

örnekler alınarak enzim aktiviteleri (U/ml), protein miktarları ve spesifik aktivite değerleri (U/g protein) belirlenmiştir (Portilla-Rivera ve ark., 2009).

### **3.2.7. Kontrollü fermantasyon koşullarının ve radyal karıştırmanın enzim üretimine etkisinin belirlenmesi**

GNB sıvı besiyerinde kontrollü fermantasyon şartlarında mTG aktivitesinin artırılması amacıyla; belirlenen optimum koşullarda (30°C, pH 6.0), fermentörde farklı karıştırma hızlarının ve havalandırma oranlarının enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir (Yan ve ark., 2005). Bu amaçla GYM besiyerinde aktifleştirilmiş *S. mobaraensis* kültürü ile %1 (v/v) oranında inoküle edilmiş 700 ml GNB sıvı besiyeri (pH 6.0) 1 litrelik fermentör sistemi (LiFlus GX, Biotron, Inc., ABD, Şekil 3.3) içerisinde sabit sıcaklıkta (30°C) 200, 400, 500, 600, 800 ve 1000 rpm radyal karıştırma hızlarında 5 gün süre ile iki tekerrürlü olarak fermantasyona bırakılmıştır.

Fermantasyon süresince besiyeri pH'sı 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH, sıcaklık ise su sirkülasyon sistemi ile otomatik olarak sabit tutulmuş ve ortama sürekli olarak 10 cm<sup>3</sup>/dak steril hava verilmiştir. Fermantasyon esnasında köpük oluşumunu engellemek için köpük kırıcı madde sisteme ilave edilmiştir. Ayrıca sabit karıştırma hızında (500 rpm) hava akış hızının mTG üretimine etkisini belirlemek için de, 2, 6 ve 10 cm<sup>3</sup>/dak hava akış hızlarında enzim üretimleri gerçekleştirilmiştir.

Fermentörden her 24 saatte aseptik şartlarda örnek alınarak enzim aktivitesi (U/ml – U/g protein) değerleri hidroksimat yöntemine göre, protein miktarı Bradford yöntemine göre, biyokütle miktarı (g biyokütle/l) ise gravimetrik olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Kontrollü ve radyal karıştırılmalı fermentör sistemi

### 3.2.8. Mikrobiyal stres faktörlerinin enzim üretimine etkilerinin belirlenmesi

Bazı stres faktörlerinin mTG enzim üretimine etkilerinin belirlenmesi amacıyla, maksimum enzim üretiminin gerçekleştirildiği çalkalamalı inkübasyon şartlarında (150 rpm, 30°C, pH 6.0), ani sıcaklık şoku, bazı tuzlar ve kimyasallar, alkoller ve proteolitik enzimler stres faktörleri olarak denenmiştir.

#### Sıcaklık stresi

Bu amaçla başlangıç pH'sı 6.0 olacak şekilde hazırlanan 100 ml'lik steril GNB besiyerine %1 (v/v) oranında GYM besiyerinde aktifleştirilmiş *S. mobaraensis* kültürü inoküle edilerek çalkalamalı inkübatörde (150 rpm) iki tekerrürlü olarak 10 gün boyunca 30°C'de enzim üretimleri gerçekleştirilmiştir. Ani sıcaklık şoku için inoküle edilmiş besiyerleri, inkübasyonun 3. gününde su banyosunda 50 ve 60°C'de 1 ve 5 dakika tutulduktan sonra sıcaklıkları hızlı bir şekilde tekrar 30°C'ye düşürülerek inkübasyona kaldığı yerden devam edilmiştir (Zhang ve ark., 2012b). Kontrol olarak sıcaklık şoku uygulanmamış örnek kullanılmıştır. İnkübasyon süresince belirli aralıklarla steril ortamda örnek alınarak besiyerinde enzim aktiviteleri (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle miktarı (g biyokütle/l) belirlenmiştir.



### Alkol stresi

Steril GNB sıvı besiyerine (pH 6.0) inkübasyon başlamadan önce aseptik şartlarda %1 ve %2 (v/v) olacak şekilde etanol ve metanol ilave edildikten sonra *S. mobaraensis* suşu ile inoküle edilen kültürler çalkalamalı (150 rpm) inkübatörde 30°C'de 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince belirli aralıklarla steril ortamda örnek alınarak besiyerinde enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle miktarı (g biyokütle/l) belirlenmiş ve alkol ilave edilmemiş kontrol örneği ile kıyaslanmıştır (Zhang ve ark., 2012b).

### Tuz ve kimyasal stresi

GNB sıvı besiyeri (pH 6.0) içerisine fermantasyon başlamadan önce 0.05, 0.10 ve 0.20 mol/l olacak şekilde NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tuzları; 0.04-0.1 g/l olacak şekilde EDTA (Zhang ve ark., 2012b) ve 0.1-1.0 µg/ml olacak şekilde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lee ve ark., 1993) ilave edilmiştir. Kimyasal madde ilave edilen besiyerleri benzer şekilde çalkalamalı inkübatörde 10 gün inkübasyona bırakılarak, belirli aralıklarla alınan örneklerde enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle miktarı (g biyokütle/l) belirlenmiştir.

### Proteolitik enzim stresi

Proteolitik enzim stresinin mTG aktivitesine etkisinin belirlenmesi amacı ile, membran filtrasyonu (0.22 µm) ile sterilize edilmiş tripsin (Merck, 1.0835) ve pepsin (Merck, 1.07185), konsantrasyonları 3 mg/ml olacak şekilde GNB besiyerlerine ilave edilmiştir. Proteolitik enzimler, birinci gruba inkübasyonun başlangıcında (0. gün) diğer gruba ise inkübasyonun 2. gününde ilave edilmiştir. Enzim ilave edilmeyen kültür ortamı ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. 10 günlük inkübasyon süresince belirli aralıklarla örnek alınarak kültür ortamının enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle miktarı (g biyokütle/l) belirlenmiştir (Kimura ve ark., 2006, Musikasang ve ark., 2009).

### 3.2.9. Mikrobiyal TG enziminin kısmi saflaştırılması

GYM besiyerinde aktifleştirilmiş taze *S. mobaraensis* kültürü ile %1 (v/v) oranında inoküle edilmiş GNB sıvı besiyerinde (pH 6.0), 30°C'de gerçekleştirilen klasik inkübasyon ile enzim saflaştırma işlemlerinde kullanılacak olan ham mTG enzim sıvısı üretimi gerçekleştirilmiştir. Sıvı besiyerindeki proteinlerin (enzimlerin) kısmi saflaştırılması amacı ile amonyum sülfat ve etil alkolle çöktürme işlemleri uygulanmıştır. Çöktürme şartları belirlendikten sonra enzim çözeltisinin protein harici kalıntılarından (safsızlıklardan) uzaklaştırılması amacı ile saflaştırma basamağına diyaliz işlemi ile devam edilmiştir. Mikrobiyal TG enzimi içeren besiyerinin kısmi saflaştırma işlemlerine hazırlanması için inkübasyon sonunda besiyerine %0.1 (v/v) oranında Tween 80 (Merck, 81706) ilave edilerek 2 saat süre ile manyetik karıştırıcıda (Daihan Scientific MSH-20D) karıştırılmıştır. Daha sonra sıvı besiyeri 7000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenerek biyokütle uzaklaştırılmış ve sıvı üst faz (ham enzim çözeltisi) kısmi saflaştırmalarda kullanılmak üzere toplanmıştır. Enzim kısmi saflaştırma işlemleri bu ham enzim sıvısında +4°C'de gerçekleştirilmiştir (Bourneow ve ark., 2012). Kısmi saflaştırma süresince elde edilen fraksiyonlarda aktivite ve protein tayinleri daha önce belirtilen standart koşullarda yapılmıştır ve elde edilen verilerden saflaştırma tabloları oluşturulmuştur.

#### Amonyum Sülfat [(NH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>] ile Çöktürme

Sıvı besiyerindeki enzim proteininin (mTG) maksimum oranda geri kazanımının sağlandığı ve aktivitenin en iyi korunduğu çöktürme şartlarının belirlenebilmesi amacı ile farklı tuz doygunluk konsantrasyonlarında (%60-90) ve sürelerde (1-6 saat) amonyum sülfat ile çöktürme işlemi yapılmıştır (Ekren, 2013). Elde edilen ham enzim sıvısındaki proteinlerin çöktürülmesi amacı ile, tüplere alınan örneklere (10 ml) farklı doygunluk oranlarında (%60, 70, 80 ve 90) amonyum sülfat tuzu ilave edilerek tuzun çözünmesi için 15 dakika boyunca tüpler vorteks ile karıştırılmış ve her bir tüp belirlenen sürelerde (1, 2, 3, 4 ve 6 saat) proteinlerin çökmesi için +4°C'de bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler 6000 rpm'de 60 dakika santrifüj edilerek sıvı faz uzaklaştırılmış ve çöktürme ilk hacimlerine (10 ml) 200 mM Tris-HCl (pH 6.0) tamponu ilave edilerek tamamlanmıştır. Tuzla çöktürme denemelerinde çöktürme

işlemlerinin etkinliğinin belirlenebilmesi için, işlem sonrası tampon ile tamamlanmış örnekler ile çöktürme öncesi örneklerde enzim aktivitesi (U/ml), protein miktarı (µg/ml) ve spesifik aktivite (U/g protein) değerleri belirlenmiştir. İşlem sonrası verim (%) ve saflaştırma katsayısı değerleri Eşitlik 3.3 ve Eşitlik 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm denemeler iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Verim (\%)} = \frac{\text{Çöktürme sonrası enzim aktivitesi (U/ml)}}{\text{Başlangıç çözelti enzim aktivitesi (U/ml)}} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\text{Saflaştırma katsayısı} = \frac{\text{Çöktürme sonrası spesifik aktivite (U/g protein)}}{\text{Başlangıç çözelti spesifik aktivitesi (U/g protein)}} \quad (3.4)$$

Amonyum sülfat ile çöktürme şartları belirlendikten sonra, ham enzim çözeltisinde iki kademeli tuzla çöktürme işleminin etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla hazırlanan enzim sıvısı (10 ml) ilk olarak %30 doygunlukta amonyum sülfat tuzu ile 1 saat çöktürme işlemine tabi tutulmuş ve daha sonra 6000 rpm'de 60 dakika santrifüj işlemi uygulanarak çökelti uzaklaştırılmıştır. Sıvı fazın üzerine toplam tuz doygunluğu %90 (1 saat) ve %80 (2 saat) olacak şekilde tekrar tuz ilave edilerek çöktürme işlemi belirtilen sürelerde uygulanmıştır. Çöktürme sonrası tüpler 6000 rpm'de 60 dakika santrifüjlenerek elde edilen çökelti 200 mM Tris-HCl (pH 6.0) tamponu ile ilk hacimlerine tamamlanmıştır. İki kademeli çöktürme işlemlerinin enzim aktivitesine ve verime etkilerini belirlemek için benzer şekilde örneklerde işlem sonrası verim (%) ve saflaştırma katsayısı değerleri hesaplanmıştır.

#### Etil alkol ile çöktürme

Ham enzim sıvısındaki proteinlerin etil alkol ile çöktürülerek konsantre edilmesi için, çözeltinin son etil alkol konsantrasyonu %50, 60, 70 ve 80 (v/v) olacak şekilde soğutulmuş (-17°C) saf etil alkol yavaş bir şekilde ilave edilmiş ve 1, 2, 3, 4 ve 6 saat sürelerinde +4°C'de tutularak proteinlerin çöktürülmesi gerçekleştirilmiştir (Cui ve ark., 2007). Tüpler daha sonra +4°C'de 6000 rpm'de 60 dakika santrifüj edilerek protein çökeltisi elde edilmiştir. Çöken proteinler daha sonra ilk hacimlerine 200 mM Tris-HCl (pH 6.0) tamponu ilave edilerek tamamlanmış ve enzim aktivitesi (U/ml) değerleri ölçülmüştür. Alkol ile çöktürme denemelerinde çöktürme işlemlerinin etkinliğinin

belirlenebilmesi için işlem sonrası tampon ile tamamlanmış örneklerde ve çöktürme öncesi örneklerde enzim aktivitesi (U/ml), protein miktarı ( $\mu\text{g/ml}$ ) ve spesifik aktivite (U/g protein) değerleri belirlenmiştir. İşlem sonrası verim (%) ve saflaştırma katsayısı değerleri Eşitlik 3.3 ve Eşitlik 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm denemeler iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

### Diyaliz işlemi

Amonyum sülfat ile çöktürme işlemlerinde belirlenen uygun koşullarda gerçekleştirilen kısmi saflaştırılmış çökeltilerdeki tuzların ve küçük moleküllerin uzaklaştırılarak daha saf bir enzim elde edilmesini sağlamak amacı ile diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz işlemleri için iki farklı teknik (ultra-filtrasyon tüpü ve diyaliz torbası) denenmiş ve en uygun diyaliz yöntemi ve şartları belirlenmeye çalışılmıştır.

İlk olarak tuzla çöktürülmüş örneklerde diyaliz işlemi ultra-filtrasyon tüpleri (Merck Amicon Ultra-15, 10 kDa cut-off) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Nagy ve Szakacs, 2008). Ultra-filtrasyon tekniği ile gerçekleştirilen diyaliz işleminin etkinliğini belirlemek amacı ile daha önce belirlenen amonyum sülfat çöktürme şartlarında kısmi saflaştırma işlemleri gerçekleştirilerek elde edilen çökelti ilk hacmine (10 ml) 200 mM Tris-HCl tamponu (pH 6.0) ile tamamlanmıştır. Enzim çözeltisi ultra-filtrasyon tüplerine konarak (10 ml) 9000 rpm'de  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 40 dakika santrifüj işlemine bırakılmış ve tüplerin üst kısmında toplanan konsantratin (500  $\mu\text{l}$ ) hacmi ilk hacmine 200 mM Tris-HCl ile tamamlanmıştır. Tüm işlem basamaklarında elde edilen çözeltilerde enzim aktivitesi (U/ml), toplam protein miktarı ( $\mu\text{g/ml}$ ) ve spesifik aktivite (U/g protein) değerleri belirlenerek ultra-filtrasyon işlemlerindeki saflaştırma katsayısı ve verim (%) değerleri hesaplanmıştır.

Diyaliz işlem basamağı olarak ayrıca klasik diyaliz torbasının kullanıldığı yöntem de denenmiştir (Cui ve ark., 2007; Bourneow ve ark., 2012). Bu işlem için amonyum sülfat ile çöktürülerek elde edilen çökeltiler uygun hacimde saf su ile çözdürüldükten sonra diyaliz torbasına (Sigma, selüloz membran 49 mm çap, 14 kDa cut off) alınıp her iki ucu kısıkaçlar yardımıyla sıkıca kapatılmıştır. Diyaliz torbalarının saf su içerisinde

+4°C’de manyetik karıştırıcı ile diyaliz süresince karışması sağlanmış ve her saat başında tampon olarak kullanılan saf su değiştirilmiştir.

### **3.2.10. Kısmi saflaştırılmış mTG enziminin karakterizasyonu**

#### Enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi (SDS-PAGE elektroforez)

Kısmi saflaştırılmış mTG enziminin moleküler ağırlığının ve safsızlıkların belirlenebilmesi için Laemmli (1970) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) tekniği kullanılmıştır. Enzim çözeltisi içerisine 500 µl SDS-PAGE örnek tamponu (3.8 ml saf su, 1 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.8 ml gliserol, 1.6 ml %10 SDS, 0.8 ml β-merkaptoetanol, 0.4 ml %0.05 bromfenol mavisi) ilave edilerek 10 dakika karıştırılan örnekler su banyosunda 95°C’de 5 dakika bekletildikten sonra tüplere alınarak santrifüj edilmiş (10 dak, 12000 rpm) ve elektroforez işlemi sıvı fazda gerçekleştirilmiştir. Örneklerdeki proteinlerin SDS-PAGE analizleri Mini Protean (Bio-Rad, USA) dikey elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Santrifüj edilen örneklerden 20 µl alınarak jele yüklenmiştir. Ayırma ve yığın jelinin akrilamid konsantrasyonu, sırasıyla, %12 (11.73 ml su, 8.75 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 tamponu, 0.35 ml %10’luk SDS, 14 ml %30’luk akrilamid/Bis, 175 µl %10’luk amonyum persülfat ve 17.5 µl TEMED) ve %4 (6.1 ml su, 2.5 ml 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 tamponu, 100 µl %10’luk w/v SDS, 1.3 ml %30’luk akrilamid/Bis, 50 µl %10’luk amonyum persülfat ve 10 µl TEMED) olacak şekilde hazırlanmıştır. Elektroforez için pH 8.3, 5X elektrot tamponu (37.5 g Tris, 180 g glisin, 12.5 g SDS saf su içerisinde çözündürülüp hacim 2.5 litreye tamamlanmıştır) hazırlanarak kullanım esnasında 1:4 oranında saf su ile seyreltilmiştir. Elektroforezde örnekler 60 Volt (yığın jeli) ve 100 Volt (ayırma jeli) sabit akımda yaklaşık 3-4 saat süreyle yürütülmüştür. Elektroforez jelindeki proteinler Commassie brilliant blue G250 (%0.1 Commassie brilliant blue G250, %10 asetik asit, %50 su, %40 alkol) ile boyanmış ve boya içermeyen aynı oranlardaki çözelti ile boya uzaklaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Moleküler ağırlık standardı olarak her jelde 10-200 kDa aralığında 14 adet protein içeren standart (SM0661 Fermentas, EU) kullanılmıştır.

### Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek üzere standart enzim aktivitesi (hidroksimat yöntemi) ölçüm şartlarında farklı Z-Gln-Gly substrat konsantrasyonlarında (0.88, 2.20, 3.53, 4.85, 6.61 mM) enzim aktivitesi değerleri ölçülmüştür. Michaelis-Menten parametrelerinin belirlenmesinde lineer regresyon metodu (Lineweaver-Burk) kullanılmış ve Michaelis sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{max}$ ) değerleri hesaplanmıştır (Cui ve ark., 2007).

### Enzim aktivitesi ve stabilitesine pH ve sıcaklığın etkisinin belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için kısmi saflaştırılmış enzime farklı pH'larda (5.0, 5.5, 5.8, 6.0, 6.2, 6.5, 7.0) tampon ilave edilerek standart enzim aktivitesi ölçüm yöntemi uygulanmış ve her pH'daki enzim aktivite değerleri (U/ml) belirlenmiştir.

Enzim stabilitesine pH'nın etkisini belirlemek için; enzim çözeltileri farklı pH'larda (pH 4.0, 6.0 ve 8.0) ve değişken zaman aralıklarında (0-60 dak) inkübe edilmişlerdir. Uygulama sonrası örnekler standart enzim aktivitesi ölçüm yöntemi uygulanarak aktivite kayıpları belirlenmiştir. Her bir deneme için başlangıç aktivite kontrol olarak kabul edilmiş ve kalan aktivite kontrol değerine göre % değer olarak saptanmıştır (Ho ve ark., 2000; Cui ve ark., 2008; Nagy ve Szakacs, 2008; Ekren 2013).

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için kısmi saflaştırılmış enzime farklı sıcaklıklarda (30, 35, 37, 40, 45, 50°C) standart enzim aktivitesi ölçüm yöntemi uygulanarak her sıcaklıktaki enzim aktivite değerleri (U/ml) belirlenmiştir (Ho ve ark., 2000). Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için saflaştırılmış enzim çözeltileri, stabilitenin belirleneceği sıcaklıklar olan 40, 45, 50 ve 55°C'de su banyosunda (Memmert WB-22, Almanya) 25 saat boyunca inkübe edilmiş ve belirli aralıklarda örnekler alınarak hızlı bir şekilde soğutulduktan sonra standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapılmıştır. Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü kontrol (100) olarak kabul edilmiş ve aktivite değişimi kontrol değerine göre % değer olarak belirlenmiştir (Nagy ve Szakacs, 2008; Ekren, 2013).

### Enzim aktivitesine metal iyonlarının ve EDTA'nın etkisinin belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot XH_2O$ ,  $Cl_2Co \cdot 6H_2O$ ) ve EDTA'nın etkisini belirlemek için Çizelge 3.3'te belirtilen şekilde reaksiyon ortamına 1 mM konsantrasyonda metal iyonları ve EDTA ilave edilmiştir (Nagy ve Szakacs, 2008; Ekren, 2013). Hiçbir metal içermeyen deney ortamı, kontrol grubu olarak kabul edilerek standart analiz koşullarında inkübasyon sonrası 11000 rpm'de 5 dakika santrüfjü edilen örneklerin 525 nm'de spektrofotometrede ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde kontrol grubu örneklerinin aktivitesi 100 kabul edilerek, deneme gruplarının kontrole göre kalan aktivite değişimleri (%) belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Farklı konsantrasyonlarda metal ve EDTA içeren deney ortamının hazırlanışı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek	Kontrol
Enzim çözeltisi	100 µl	100 µl	100 µl
200 mM Tris-HCl (pH6.0) tamponu	180 µl	180 µl	200 µl
Metal iyonları	20 µl*	20 µl*	-
12.5 mM Glutation	25 µl	25 µl	25 µl
125 mM Hidroksilamin	25 µl	25 µl	25 µl
37.5 mM Z-Gln-Gly	-	75 µl	75 µl
Saf su	75 µl	-	-
37°C'de 1 saat inkübasyon			
%15 TCA - %5 $FeCl_3$ çözeltisi	425 µl	425 µl	425 µl

\*1 mM metal içeren deney ortamı için 21.25 mM stok metal çözeltisi kullanılmıştır.

#### **3.2.11. İstatistiksel değerlendirme**

Üç veya iki tekerrürlü olarak elde edilen analiz sonuçlarının ortalamaları alınarak standart sapmaları ile birlikte verilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi ve karşılaştırılması Minitab programında (Minitab release 12.1, Minitab inc., 1998) varyans analizleri (ANOVA) ile yapılmıştır.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. *Streptomyces* Türlerinin Aktifleştirilmesi, Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Saflık Kontrolleri

Literatür bilgilerinde TG enzim üreticisi olarak gösterilen ve Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı, Tarımsal Araştırma Merkezi (USDA) kültür koleksiyonunda yer alan *Streptomyces* cinsine ait 5 farklı türdeki bakteri çalışma kapsamına alınmıştır. *Streptomyces mobaraensis* NRRL B-3729, *Streptomyces ladakanum* NRRL ISP-5587, *Streptomyces lividans* NRRL B-12275, *Streptomyces sioyaensis* NRRL B-5408 *Streptomyces platensis* NRRL B-5486 ve *Streptomyces hygroscopicus* ISP-5578 bakteri suşlarının aktifleştirilmesi, saflık kontrolünün yapılması ve hücre morfolojilerinin belirlenmesi amacı ile materyal yöntem bölümünde belirtilen prosedürler uygulanmıştır.

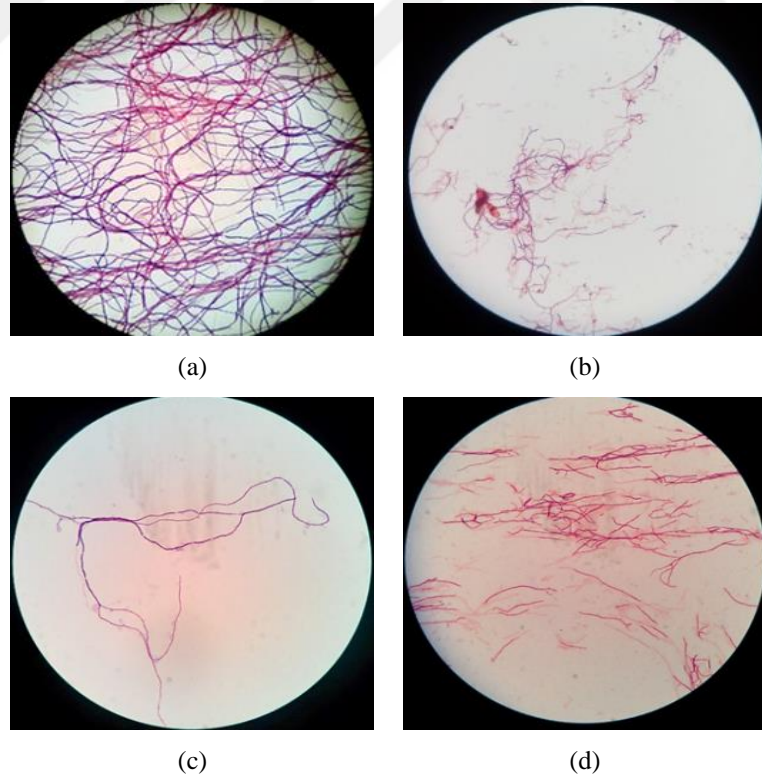
*Streptomyces* bakteri kültürlerinin aktifleştirme ve canlandırma işlemleri için; DSMZ kataloğunda belirtilen prosedür doğrultusunda suşların aktifleştirilme işlemleri “GYM *Streptomyces* sıvı besiyeri” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. GYM sıvı besiyerlerine inoküle edilen bazı bakteri kültürlerinde 30°C’de 5 günlük inkübasyon sonucunda misel yapıda bir gelişme gözlemlenmiştir. Bakteriyel gelişim gözlemlenen tüplerden steril ortamda alınan örneklerin GYM sıvı besiyerine tekrar inokülasyonları yapılarak aktifleştirme işlemleri her 5 günde bir tekrarlanmıştır. Aktifleştirme işlemi ilk olarak *S. lividans* NRRL B-12275 kültürü için başarılı bir şekilde gerçekleştirildikten sonra diğer mikroorganizma suşlarının (*Streptomyces mobaraensis*, *S. ladakanum*, *S. sioyaensis*, *S. platensis* ve *S. hygroscopicus*) liyofilize kültürleri için de aynı aktifleştirme işlemleri uygulanmıştır.

Aktifleştirme işlemleri basamağında, *S. hygroscopicus* ISP-5578 türü ile gerçekleştirilen inkübasyonlarda, GYM sıvı besiyerinde herhangi bir bakteriyel gelişimin olmadığı belirlenmiştir. Bu durum, *S. hygroscopicus* türünün laboratuvarımıza transferi esnasında mikrobiyal canlılığını kaybettiği durumunu düşündürmüştür. Ayrıca *S. sioyaensis* ve *S. platensis* türlerinin aktifleştirme basamağında hücre gelişimlerinin diğer bakteri kültürlerine oranla daha yavaş (7-10 günlük inkübasyon) gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, aktifleştirme işlem basamaklarında özellikle *Streptomyces mobaraensis*,



*S. ladakanum* ve *S. lividans* türlerinde 5 günlük inkübasyon sürelerinde yüksek oranda ve benzer bir mikrobiyal gelişme sağlanmıştır.

Aktifleştirme işlemleri tamamlandıktan sonra kültürlerin saklanması, koloni-hücre morfolojilerinin incelenmesi, saflık kontrollerinin yapılması amacı ile bakteri kültürlerinin (*S. hygrosopicus* hariç) katı besiyerlerine (yatık agar ve petri) ekimleri gerçekleştirilmiştir. Katı besiyerinde geliştirilen *Streptomyces* türlerinin hücre morfolojileri mikroskop (büyütme 100x) ile incelenmiştir. Yapılan inceleme sonucunda hücrelerin dallanmış yapıda miseller oluşturduğu gözlemlenmiştir. Mikroskobik hücre morfolojisinin daha belirgin incelenebilmesi, Gram reaksiyonun belirlenebilmesi ve saflık kontrollerinin yapılabilmesi için aktifleştirilmiş tüm *Streptomyces* türlerine Gram boyama işlemi uygulanmıştır. Boyama sonucunda eflatun-mor renkli bakteri görüntüleri elde edilirken, misel yapılar ise açık bir şekilde gözlemlenmiştir. Aktifleştirilen kültürlerin saf halde buldukları ve herhangi bir bulaşmaya maruz kalmadıkları mikroskobik olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Streptomyces* kültürlerine ait Gram boyama görüntüleri (a) *S. ladakanum*, (b) *S. lividans*, (c) *S. mobaraensis*, (d) *S. platensis*

#### 4.2. Enzim Üretimine Besiyeri Bileşimi, Başlangıç pH'sı ve İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi

Mikrobiyal TG üretimi için gerekli olan fermantasyon şartları ile enzim üreticisi hücrelerin gelişimi için gerekli olan şartlar farklı olabilmektedir. Kesikli bir kültürde mTG oluşum hızı, aktivitesi ve verimliliği; pH, sıcaklık, DO gibi çevresel parametrelere ve besiyeri bileşimine göre değişebilmektedir. Yüksek miktarlarda ve verimlilikte aktif bir mTG üretimi gerçekleştirebilmek için hücre büyümesi ile birlikte mTG sentez koşullarının da optimize edilmesi gerekmektedir (Zheng ve ark., 2001; Zheng ve ark. 2002b; Yan ve ark., 2005; Zhang ve ark. 2009). Bu yüzden *Streptomyces* türlerinin enzim üretimini arttırmaya yönelik, substrat optimizasyonu, metabolik optimizasyon ile iç ve dış faktörler (sıcaklık, pH, DO, vb.) gibi değişkenlerin etkileri ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

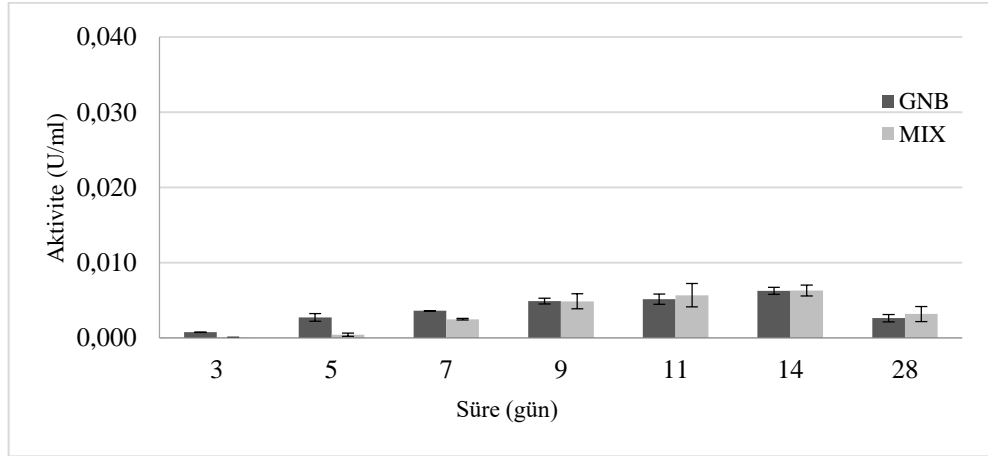
Mikrobiyal TG enzim üretim şartlarının belirlenmesi amacı ile üretim koşulları (besiyeri başlangıç pH'sı, inkübasyon sıcaklığı) ve besiyeri bileşenleri değiştirilerek üç farklı bakteri kültürü (*S. mobaraensis*, *S. ladakanum*, *S. lividans*) ile klasik (statik) inkübatörde gerçekleştirilen inkübasyonlara ait deneme planı Çizelge 3.1'de verilmiştir. Deneme planına ait enzim aktivitesi ve spesifik aktivite sonuçları EK-A'da verilmiştir. Çalışmada kullanılan üç farklı *Streptomyces* sp.'nin kültür ortamındaki enzim üretim miktarları incelendiğinde, tüm koşullarda (besiyeri, pH, sıcaklık) en yüksek aktivite değerleri *Streptomyces mobaraensis* NRRL B-3729 ile gerçekleştirilen inkübasyonlarda elde edilmiştir ( $p < 0.05$ ). *S. ladakanum* ve *S. lividans* türleri ile inoküle edilmiş besiyerlerinde ise tüm deneme deseni kapsamında (pH, sıcaklık, besiyeri) ölçülebilir düzeyde bir enzim aktivitesi ( $< 0.001$  U/ml) belirlenmemiştir. Bu yüzden *S. ladakanum* ve *S. lividans* kültürleri ile gerçekleştirilen inkübasyonlara ait sonuçlara EK-A'da yer verilmemiştir. Çalışmada kullanılan kültürlerin mTG üretim miktarları tür bazında incelendiğinde, yapılan birçok çalışmayla benzer bir şekilde en iyi mTG üretici türün *S. mobaraensis* olduğu görülmüştür. Literatürde bu türün özellikle de ticari mTG üretiminde önemli bir paya sahip olduğu belirtilmektedir (Ando ve ark., 1989). Diğer taraftan yapılan bazı çalışmalarda diğer mikroorganizma cinslerinin ve türlerinin de mTG üreticisi olarak kullanılabilceği belirtilmekte ve bu doğrultuda *S. lydicus* (1.30 U/ml), *S. ladakanum* (0.34 U/ml), *S. sioyansis* (3.30 U/ml), *S. platensis* (1.40 U/ml),

*Bacillus aneurinolyticus* (0.80 U/ml) ve *Pseudomonas putida* (1.40 U/ml) gibi bazı mikroorganizmalar ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Bech ve ark., 2001). Bazı araştırmacılar ise son yıllarda *S. ladakanum* ve *S. lividans* türlerinin genetik modifikasyonu ile başarılı bir şekilde enzim üretimini gerçekleştirmişlerdir (Lin ve ark., 2006; Kieliszek ve Misiewicz, 2014).

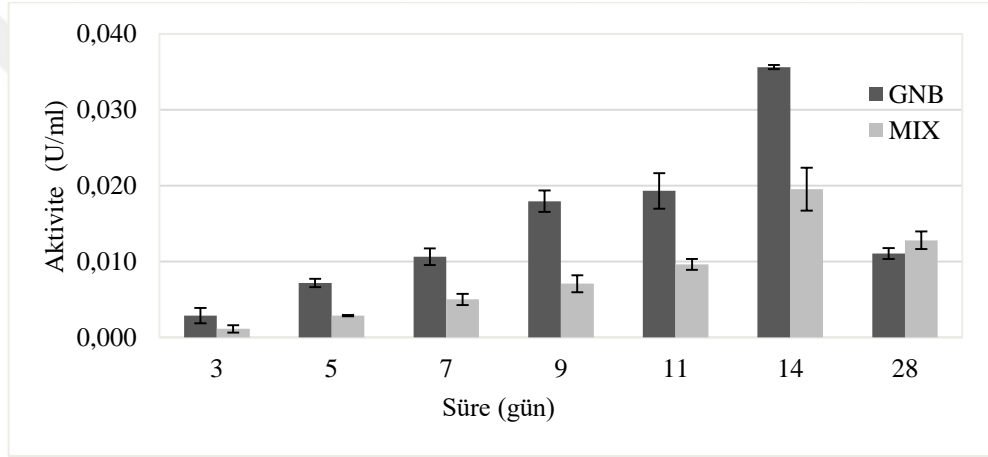
Mikrobiyal TG aktivitesinin bakteri türü, kültür ortamı ve ekim koşulları gibi birçok faktöre bağlı olması her tür için uygun kültür şartlarının belirlenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Şekil 4.2 incelendiğinde, *S. mobaraensis* NRRL B-3729 ile pH 6.0'da 30°C'lik inkübasyonun 14. gününde en yüksek enzim aktivitesi değeri nişasta-glukoz bazlı GNB besiyerinde 0.036 ( $\pm 0.000$ ) U/ml olarak belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Aynı inkübasyon koşullarında soya unu bazlı MIX besiyerleri için en yüksek enzim aktivitesi ise 0.020 ( $\pm 0.003$ ) U/ml olarak saptanmıştır. Farklı koşullarda gerçekleştirilen inkübasyonlara ait spesifik aktivite değerleri EK-A da verilmiş olup, GNB besiyerinde en yüksek spesifik aktivite 716.08 ( $\pm 0.00$ ) U/g protein, MIX besiyerinde ise 446.55 ( $\pm 46.83$ ) U/g protein olarak belirlenmiştir. MIX besiyerinde, 14. günde (30°C) ulaşılan en yüksek aktivite değeri (0.020  $\pm 0.003$  U/ml), GNB besiyerinde 30°C (9. ve 11. gün) ve 40°C'de (9., 11., 14. gün) ulaşılan aktivite değerleri ile benzer bulunmuştur ( $p > 0.05$ ). GNB besiyerinde pH 6.0 değerinde gerçekleştirilen inkübasyonlarda en düşük enzim aktivitesi değerleri 20°C'de, MIX besiyerinde ise 20°C ve 40°C'de elde edilmiştir. 20°C'de gerçekleştirilen inkübasyonda her iki besiyeri için ulaşılabilen maksimum enzim aktivitesi değerleri 14. günde 0.006 U/ml olarak gerçekleşirken, 9. ve 11. gün sonuçları ile benzer bulunmuştur ( $p > 0.05$ ). Elde edilen bu düşük aktivite değerleri, düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilen inkübasyonlarda *Streptomyces* türlerinin lag fazının uzaması ile açıklanabilmektedir (Zheng ve ark., 2002b). GNB besiyerinde (pH 6.0) 40°C'de gerçekleştirilen üretimde enzim aktivitesi 0.024 ( $\pm 0.003$ ) U/ml, spesifik aktivite ise 417.39 ( $\pm 9.44$ ) U/g protein olarak gerçekleşmiş ve MIX besiyerinde (30°C, 14. gün, pH 6.0) ulaşılan en yüksek aktivite değeri (0.020 U/ml) ile benzer bulunmuştur ( $p > 0.05$ ). MIX besiyerinde 40°C'de gerçekleştirilen inkübasyonlarda en yüksek enzim aktivitesi değerleri 9., 11. ve 14. günlerde ve çok düşük miktarlarda (0.004-0.005 U/ml) elde edilebilmiştir ( $p > 0.05$ ). MIX besiyeri ile yüksek sıcaklıklarda enzim sentezinin en yüksek değerine daha kısa sürede ulaştığı görülmektedir. Ayrıca tüm örneklerin (pH 6.0) enzim aktivitesi değerlerinin inkübasyonun 14. gününden sonra hızlı bir şekilde

azaldığı belirlenmiştir. Maksimum enzim üretiminden sonra aktivitenin hızlı bir şekilde azalması, hücrelerin durgun ve ölüm fazına girdikten sonra fermantasyonda açığa çıkan bazı bileşiklerin (amonyum iyonu, proteolitik enzimler, vb.) etkisi ile inhibisyonuna ve parçalanmasına bağlanabilir (Zhu ve ark., 1996; Bourneow ve ark., 2012). Sıcaklığın mTG sentezine olan etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar inkübasyon sıcaklıklarının hem hücre gelişimini hem de mTG sentezini doğrudan etkileyebildiğini bildirmektedir (Zheng ve ark., 2001; Yan ve ark., 2005). Zheng ve ark. (2002b) farklı inkübasyon sıcaklıklarının (25, 28, 30, 32, 33.5 ve 35°C) *S. mobaraensis* türünün mTG enzim üretim miktarına etkisini araştırdıkları bir çalışmada en iyi üretimi 30°C’de başarılı bir şekilde (2.94 U/ml) gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada inkübasyonda kullanılan tek sıcaklık değerlerinin spesifik hücre gelişim ve mTG sentez evrelerine farklı oranlarda etkide bulduklarını da göstermişlerdir. Diğer taraftan Portilla-Rivera ve ark. (2009) *S. ladakanum* türü ile 26°C’de enzim üretimini gerçekleştirmişlerdir.

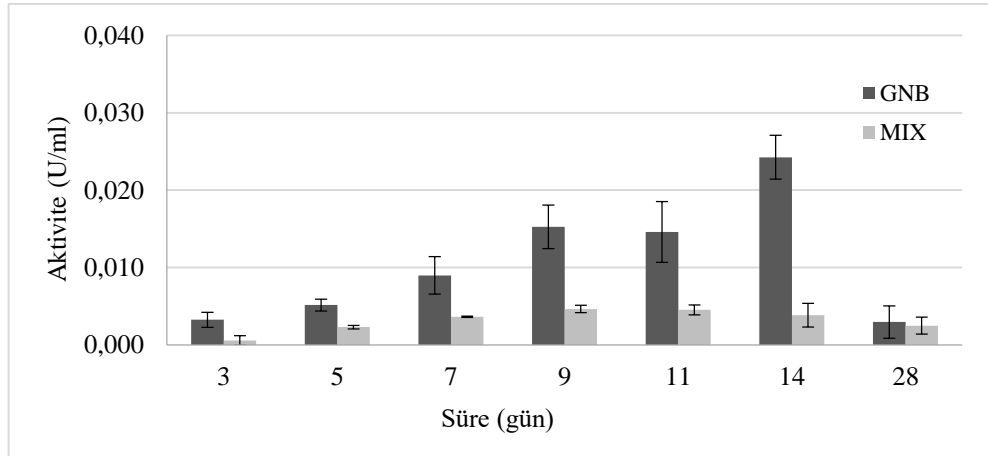
Besiyeri başlangıç pH değeri 7.0 olarak gerçekleştirilen enzim üretim denemelerinde, GNB besiyerinde en yüksek enzim aktivitesi 30°C’de 14. ve 28. günde 0.01 U/ml olarak, spesifik aktivite ise 14. ve 28. günde 216.77 ( $\pm 17.42$ ) ve 196.83 ( $\pm 15.55$ ) olarak gerçekleşmiştir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.3). GNB besiyerinde (pH 7.0) ulaşılan maksimum enzim aktivitesi değeri MIX besiyerinde (pH 7.0) 14. günde ulaşılan değere ( $0.005 \pm 0.0028$  U/ml) göre daha yüksek bulunmuştur. 20 ve 40°C’de pH 7.0’de gerçekleştirilen inkübasyon süresince mTG enzim aktivitesinde çok hafif bir artış gözlenirken, en yüksek aktivitelere 28. günde ulaşılmıştır. Tez çalışmasında pH 8.0’de elde edilen enzim aktivitesi değerleri çok düşük ( $< 0.001$  U/ml) düzeylerde gerçekleştiği için sonuçlara yer verilmemiştir.



(a)

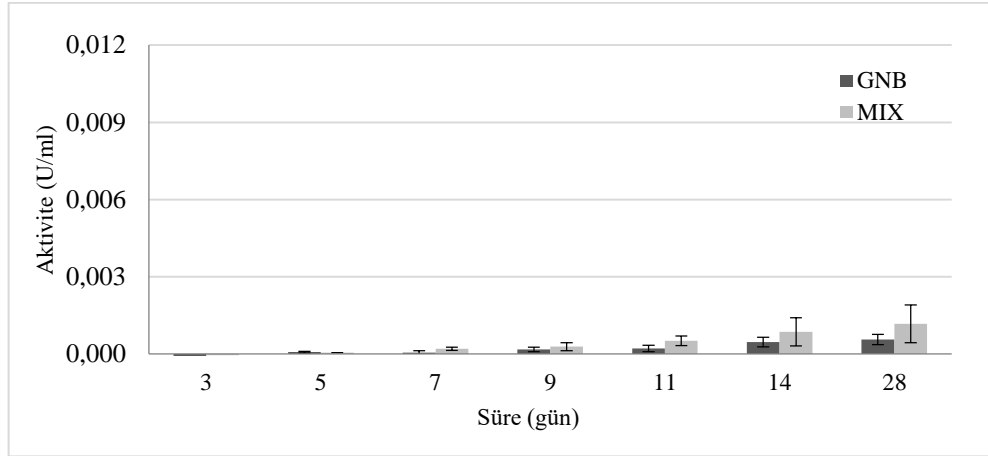


(b)

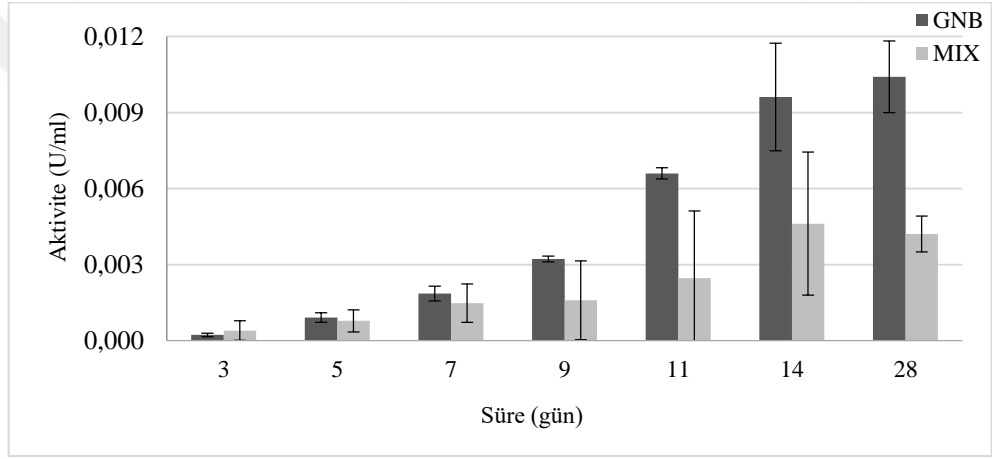


(c)

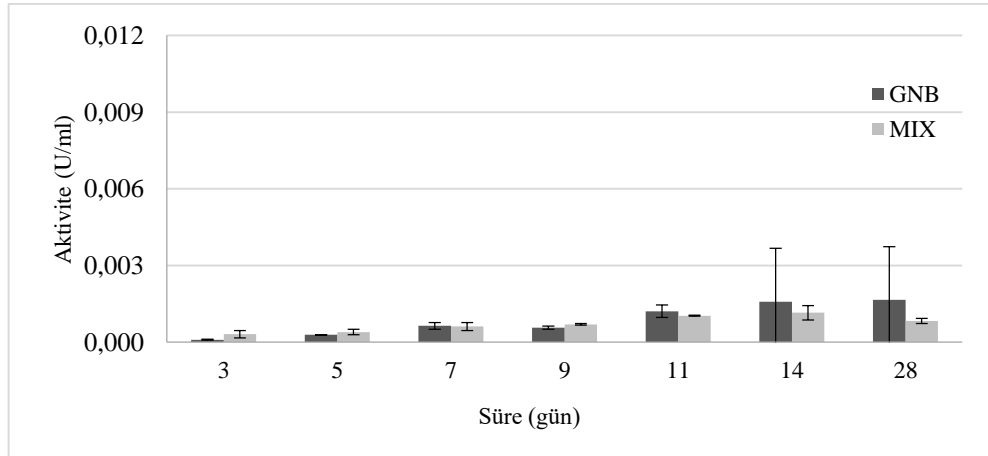
Şekil 4.2. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının *S. mobaraensis* türünün GNB ve MIX besiyerlerindeki (pH 6.0) enzim aktivitesine etkisi (a) 20°C, (b) 30°C, (c) 40°C



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.3. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının *S. mobaraensis* türünün GNB ve MIX besiyerlerindeki (pH 7.0) enzim aktivitesine etkisi (a) 20°C, (b) 30°C, (c) 40°C

Besiyeri seçiminin enzim aktivitesine etkileri incelendiğinde, sıcaklık değerlerinde (30 ve 40°C, 28. gün hariç) GNB besiyeri (pH 6.0) ile elde edilen aktivite değerlerinin, MIX besiyeri (pH 6.0) ile elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu gözlenmiştir ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.2). Temel karbon kaynağı olarak nişasta-glukoz ve azot kaynağı olarak pepton kullanılan GNB besiyerinde en yüksek enzim aktivitesi değerinin (0.036 U/ml, 14. gün, 30°C) literatürde yapılan çalışmalar ile uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir. Zhu ve ark. (1998) yaptıkları çalışma sonucunda pepton ve nişasta gibi bileşenlerin besiyerinde kullanımı ile proteaz, amilaz gibi bazı indükleyici enzimlerin sentezini uyararak mTG sentezi için gerekli öncül bileşiklerin oluşumunu sağlayacağını belirtmişlerdir. Diğer taraftan, azot kaynağı olarak besiyerinde soya, kazein gibi proteinlerin kullanılması ile bunların ortamdaki mTG enzimi tarafından substrat olarak kullanılarak mikroorganizmaların bu kaynaklardan yararlanması sınırlanmaktadır (Zhu ve ark., 1996; Zhu ve ark., 1998; Portilla-Rivera ve ark., 2009; Bourneow ve ark., 2012). Bazı araştırmacılar ise kazein, soya gibi protein kaynaklarının kullanımı ile mTG aktivitesinin arttığını bildirmektedirler (Junqua ve ark., 1997; Téllez-Luis ve ark., 2004b; Guerra-Rodríguez ve Vazquez, 2014; Zilda, 2014). Ayrıca bazı çalışmalarda besiyerinde gliserol kullanımı ile viskozitede bir artışın meydana geldiği ve bu durumun da aktiviteyi olumsuz etkilediğini bildirilmektedir (Portilla-Rivera ve ark., 2009). Bourneow ve ark. (2012) farklı besiyerleri içerisinde pepton ve nişasta ile hazırladıkları besiyerinde *Streptomyces* sp.'den (0.85 U/ml), Zhu ve ark. (1996) ve Zheng ve ark. (2001, 2002a) ise benzer besiyerinde 1.80-3.40 U/ml olarak en yüksek enzim aktivite değerlerine ulaşmışlardır. Iancu ve ark. (2009) nişastalı besiyerinde 0.05-0.20 U/ml aktivite değeri elde ederken, Bahrim ve ark. (2010) pepton-glukoz kullanarak 0.43 U/ml enzim aktivitesi değerlerine ulaşmışlardır.

Sonuç olarak, farklı besiyeri (GNB ve MIX), sıcaklık (20, 30, 40°C) ve pH (6.0, 7.0, 8.0) değerlerinde *Streptomyces* türleri ile gerçekleştirilen enzim üretim denemelerinde mTG enzim üretiminin önemli ölçüde besiyeri, sıcaklık, pH değişimlerinden etkilendiği ve en yüksek enzim aktivitesinin (0.036 U/ml) GNB sıvı besiyerinde, *S. mobaraensis* kültürü ile 30°C ve pH 6.0'da elde edildiği belirlenmiştir. Çalışmanın bu aşamasında ulaşılan en yüksek enzim aktivite değerlerinin literatürde yapılan diğer çalışmalara oranla düşük düzeyde kaldığı görülmektedir. Bu durum, inkübasyonun küçük hacimlerde (35 ml) ve klasik (statik) inkübatörde gerçekleştirilmiş olmasına

bağlanmıştır. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında *S. mobaraensis* kültürü seçilerek, enzim üretim miktarının artırılmasına yönelik, en yüksek enzim aktivitesinin elde edildiği koşullarda (pH 6.0, 30°C, GNB besiyeri) çalkalama, karıştırma, hava sirkülasyon oranı, stres faktörleri gibi diğer parametrelerin etkisi incelenmiştir.

### **4.3. TG Üretimine Karıştırma Şeklinin ve Hızının Etkisi**

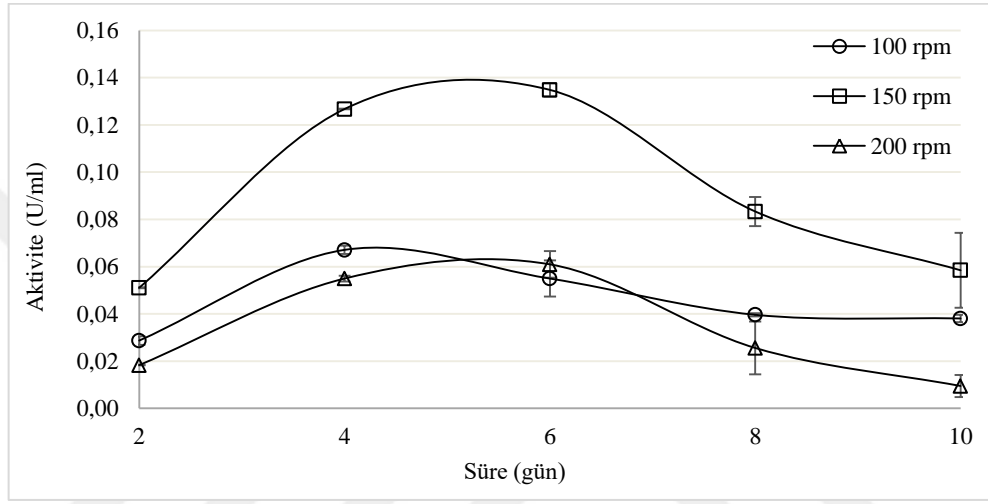
#### **4.3.1. Çalkalamalı (orbital) karıştırmanın etkisi**

Özellikle aerob mikroorganizmaların sıvı ortamlarda geliştirilmesinde karıştırmanın önemi büyük bir paya sahiptir. Çünkü karıştırma işlemi, gerek oksijen, ısı ve kütlenin transferi açısından gerekse besiyerinin homojen kalması ve bazı agregasyonların önlenmesi açısından oldukça önemli bir parametredir. Karıştırma işlemi mikrobiyal gelişimi etkilemekle birlikte hücrelerin sentez reaksiyonlarını da etkileyerek mTG gibi birçok enzim üretimini de etkileyebilmektedir. Ayrıca besiyerinin kimyasal bileşimi ve fiziksel karakteri, kullanılan kültürün türü gibi birçok parametre de karıştırmanın etkinliğini dolaylı olarak etkileyebilmektedir. Bu yüzden karıştırma tipinin ve hızının belirlenmesinde bu tür etkiler göz önüne alınarak optimum karıştırma şartların belirlenmesi gerekmektedir (Portilla-Rivera ve ark., 2009; Bourneow ve ark., 2012).

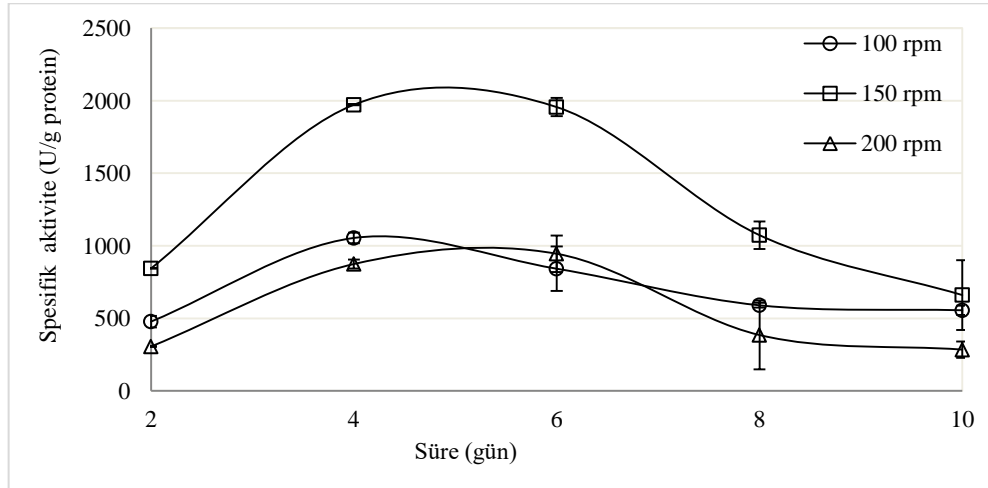
Çalkalamalı (orbital) inkübatörde GNB besiyeri kullanılarak (30°C, pH 6.0) farklı hızlarda (100, 150, 200 rpm) gerçekleştirilen enzim üretim denemelerine ait aktivite (U/ml) ve spesifik aktivite (U/g protein) değerleri EK-B'de verilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi değerine 150 rpm çalkalama hızlarında gerçekleştirilen inkübasyonun 6. gününde ( $0.135 \pm 0.003$  U/ml,  $p < 0.05$ ), spesifik aktivite değerine ise aynı örneğin 4. ve 6. gününde (sırasıyla  $1971.93 \pm 4.28$  ve  $1955.90 \pm 63.39$  U/g protein) ulaşılmıştır (Şekil 4.4). 150 rpm çalkalama hızında tüm inkübasyon sürelerinde (10. gün hariç) ölçülen aktivite ve spesifik aktivite değerleri diğer karıştırma hızlarına göre daha yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). En yüksek aktiviteye ulaşılan 150 rpm çalkalama hızında enzim sentezi 4. güne kadar hızlı bir şekilde artmış 6. günde en yüksek seviyeye ulaştıktan sonra hızlı bir şekilde azalarak 10. günde  $0.058 (\pm 0.016)$  U/ml değerine düşmüştür. 100 rpm çalkalama hızında ise 4. günde en yüksek aktiviteye ( $0.067 \pm 0.002$  U/ml) ulaşan örneklerin aktivite değerleri daha yavaş bir şekilde azalarak 10. günde  $0.038 (\pm 0.002)$



U/ml'ye düşmüştür. Diğer taraftan 200 rpm çalkalama hızlarında gerçekleştirilen inkübasyonlarda 4. ve 6. günde en yüksek aktiviteye ulaşan ( $0.055\pm 0.001$  ve  $0.061\pm 0.006$  U/ml) örnekler daha sonra karıştırma hızının yüksekliğine bağlı olarak çok hızlı bir şekilde azalmış ve 10. günde örnekler arasında en düşük seviye olan  $0.009$  ( $\pm 0.005$ ) U/ml'ye gerilemiştir. Tüm çalkalama hızlarından elde edilen spesifik aktivite değerleri de aktivite ile benzerlik göstermiştir (Şekil 4.4).



(a)



(b)

Şekil 4.4. Çalkalamalı (orbital) inkübatörde ( $30^{\circ}\text{C}$ , pH 6.0) enzim üretim denemelerine ait (a) enzim aktivitesi (U/ml) ve (b) spesifik aktivite (U/g protein) değerleri

Çalkalamalı inkübatörde GNB besiyerinde ( $30^{\circ}\text{C}$ , pH 6.0) 150 rpm'de gerçekleştirilen enzim üretim denemelerinde 6 günlük inkübasyon ile elde edilen aktivite değerinde ( $0.135\pm 0.003$  U/ml), aynı şartlarda klasik (statik) inkübasyonda 14. günde ulaşılan

değere göre (0.036 U/ml) yaklaşık 3.75 katlık bir artış sağlanmıştır. Böylelikle hem enzim aktivitesinde önemli bir artış hem de üretim süresinde bir kısalma sağlanabilmiştir. Bourneow ve ark. (2012) ise benzer bir besiyeri ile 150 rpm çalkalama hızlarında *S. mobaraensis* türü kullanarak yaptıkları çalışmada 48 saatlik inkübasyon sonunda enzim aktivitesini 0.85 ( $\pm 0.01$ ) U/ml belirlemişlerdir. Aynı çalışmada daha büyük hacimde besiyeri kullanıldığında, aynı aktivite değerine 18 saat sonunda ulaşılmıştır. Portilla-Rivera ve ark. (2009) farklı orbital karıştırma hızlarının (200, 300, 400 rpm) *S. ladakanum*'un enzim üretimine etkilerini araştırdıkları çalışmada, melas ve gliserol ile hazırlanan besiyerinde 300 rpm karıştırma hızlarında en yüksek enzim aktivitesine (0.460 U/ml, 72 saat) ulaştıklarını, daha yüksek karıştırma hızlarında enzimin denatüre olması sonucu ve daha düşük hızlarda ise difüzyon problemlerinden dolayı aktivitenin azaldığını bildirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada ayrıca besiyerinde şeker kamışı melası (0.240 U/ml, 400 rpm), gliserol (0.240 U/ml, 200-300 rpm) ve her iki bileşiğin karışımının (0.460 U/ml, 300 rpm) kullanılması ile elde edilen en yüksek aktivite değerlerinin de farklı olduğunu belirlemişlerdir. Tez çalışmasında da örneklerin aktivite değerleri 150 rpm çalkalama hızlarından yüksek ve düşük olan hızlarda benzer bir davranış sergilemiştir. Çalkalamalı inkübasyonda, substrat ile mikroorganizmanın etkileşimi daha kolay gerçekleştiği ve havalandırma sağlandığı için, çalkalama işleminin enzim üretimini ve aktivitesini olumlu yönde etkilediği düşünülmektedir.

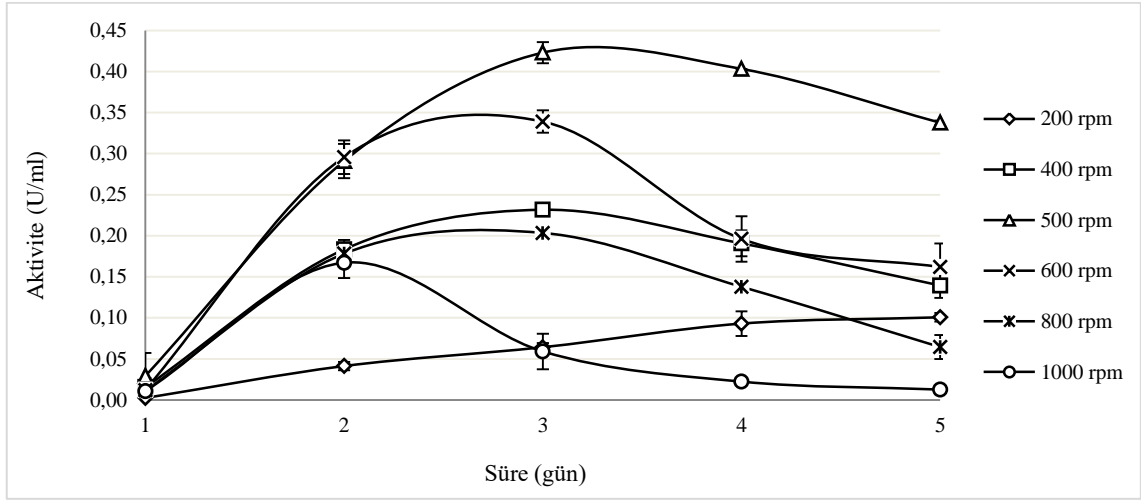
#### **4.3.2. Kontrollü fermantasyon ve radyal karıştırmanın etkisi**

Çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen denemelerde enzim üretiminde artış sağlanmasından dolayı karıştırma ve havalandırmanın aktivite artışında önemli bir faktör olduğu ve bu sebepten kontrollü bir fermantasyon sistemi ile enzim üretiminde önemli bir artış sağlanması düşünülmüştür. Bu amaçla farklı karıştırma hızlarında kontrollü bir fermentörde (30°C, pH 6.0) gerçekleştirilen üretimlerde edilen enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle miktarına (g biyokütle/l) ait deneysel veriler Çizelge EK-C.1 ve EK-C.2'de verilmiştir.

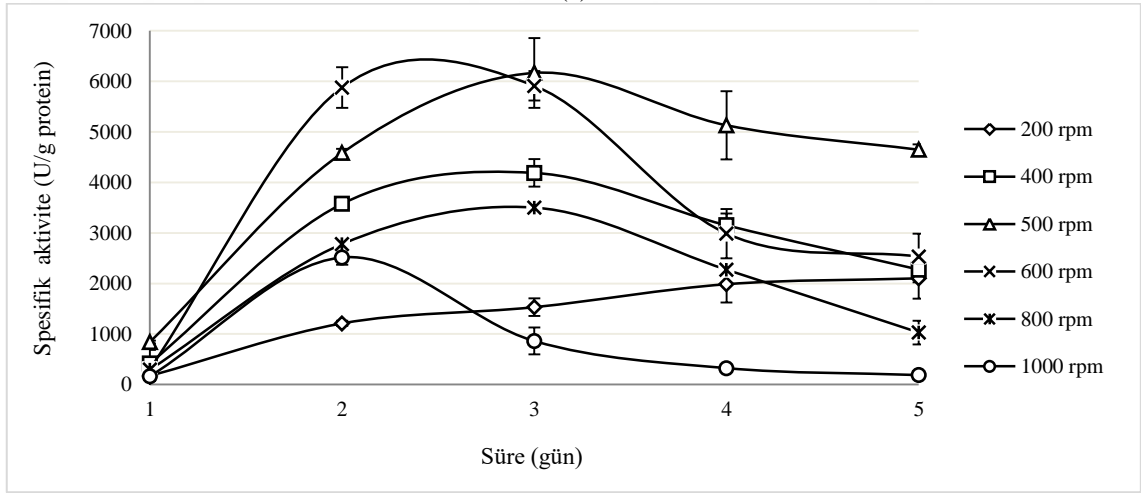
Şekil 4.5a incelendiğinde en yüksek enzim aktivitesi değerine (0.423 $\pm$ 0.013 U/ml,  $p < 0.05$ ) 500 rpm karıştırma hızında fermantasyonun 3. gününde ulaşıldığı ve aktivitenin bu günden sonra azalarak 5. günde 0.338 ( $\pm 0.003$ ) U/ml değerine gerilediği

belirlenmiştir. 500 rpm karıştırma hızlarında fermantasyonun 2. gününde elde edilen aktivite değeri 600 rpm'de ulaşılan aktivite değeri ile benzer ( $0.29 \text{ U/ml}$ ,  $p>0.05$ ) olduğu görülmüştür. Ancak fermantasyonun 2. gününden itibaren 600 rpm karıştırma hızında elde edilen aktivite değerlerinin 500 rpm'e kıyasla da düşük olduğu gözlenmiştir. 600 rpm karıştırma hızında 3. günde ulaşılan maksimum enzim aktivite değeri ( $0.339\pm 0.014 \text{ U/ml}$ ), 500 rpm karıştırma hızında elde edilen aktiviteye oranla daha düşük olarak belirlenmiştir ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.5a). Ayrıca 600 rpm karıştırma hızında en yüksek enzim aktivitesinin elde edildiği 3. günden sonra aktivitenin daha hızlı düşerek fermantasyonun bitiminde  $0.162 (\pm 0.029) \text{ U/ml}$  olarak belirlendiği görülmüştür. 800 ve 400 rpm karıştırma hızlarında elde edilen enzim aktivitesi değerleri fermantasyon süresince benzer bir eğilim göstermekle birlikte fermantasyonun 2. gününden sonra 400 rpm karıştırma hızlarında elde edilen aktivite değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Bu durum yüksek karıştırma hızının enzim aktivitesinde meydana getirdiği kayıplar ile açıklanabilmektedir. Diğer taraftan en yüksek karıştırma hızı olan 1000 rpm'de elde edilen aktivite sonuçları incelendiğinde maksimum aktiviteye ( $0.167\pm 0.019 \text{ U/ml}$ ) daha kısa sürede (2. gün) ulaşılırken hızlı karıştırmanın kuvvetli mekanik etkilerinden dolayı aktivite çok hızlı azalarak fermantasyon işlemi en düşük enzim aktivitesi değeri ile tamamlanmıştır (Şekil 4.5). Karıştırma ve havalandırma etkinliğinin en düşük düzeyde gerçekleştiği 200 rpm hızında ise aktivitenin fermantasyon süresince artarak 5. günde en yüksek değerine ( $0.101\pm 0.005 \text{ U/ml}$ ) ulaştığı belirlenmiştir.

Fermantasyon süresince spesifik aktivitelerdeki değişimler incelendiğinde (Şekil 4.5b) en yüksek spesifik aktivite değerleri, 500 rpm karıştırma hızında fermantasyonun 3. gününde  $6167.19 (\pm 688.98) \text{ U/g}$  protein, 600 rpm karıştırma hızında ise 3. günde  $5911.98 (\pm 291.55) \text{ U/g}$  protein olarak belirlenmiştir ( $p>0.05$ ). Özellikle 600 rpm karıştırma hızında fermantasyonun 2. gününde en yüksek spesifik aktivite değerine ulaşılması, bu hızlarda *S. mobaraensis* türü tarafından üretilen mTG enzim proteininin diğer üretilen proteinlerden daha önce sentezlenmeye başladığını göstermektedir. Bu durumun artan karıştırma hızının mikrobiyal gelişmeyi teşvik etmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Diğer karıştırma hızlarında elde edilen spesifik aktivite değerleri incelendiğinde ise, kültür ortamında üretilen proteinler ile mTG enzim proteininin sentezinin benzer bir eğilim içerisinde olduğu görülmektedir.



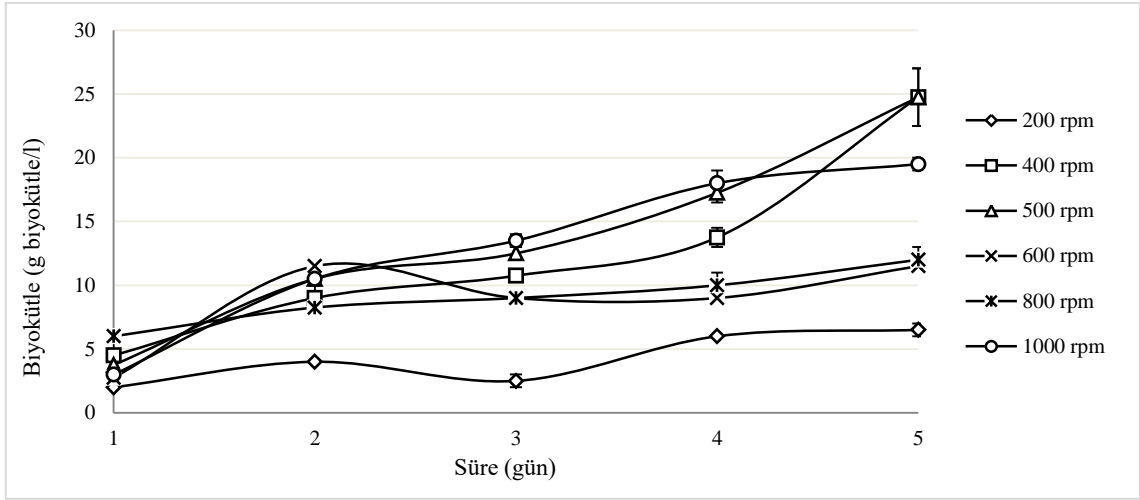
(a)



(b)

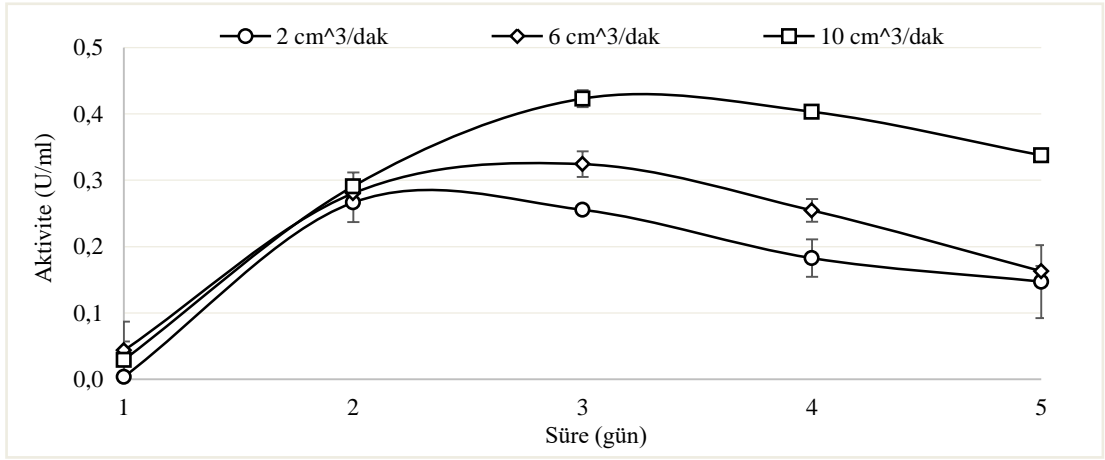
Şekil 4.5. Fermentörde farklı radyal karıştırma hızlarının (a) enzim aktivitesine (U/ml) (b) spesifik aktiviteye (U/g protein) etkisi

Yüksek karıştırma hızları kütle ve oksijen transferi açısından mikrobiyal gelişmeyi olumlu yönde etkilerken, mekanik stres ve oksijen stresi gibi unsurlar mTG enzim aktivitesini olumsuz etkileyebilmektedir. Farklı karıştırma hızlarında gerçekleştirilen mTG fermentasyonlarında elde edilen biyokütle oranları Şekil 4.6'da incelendiğinde fermentasyon süresince biyokütle miktarlarının arttığı görülmüş ve en yüksek değer 400 rpm ve 500 rpm karıştırma hızlarında 5. günde 24.75 g biyokütle/l olarak ölçülmüştür ( $p < 0.05$ ). 1000 rpm karıştırma hızında fermentasyonun 4. gününe kadar elde edilen biyokütle miktarlarının 500 rpm karıştırma hızında elde edilen değerler ile benzer olduğu belirlenmiştir ( $p > 0.05$ ).

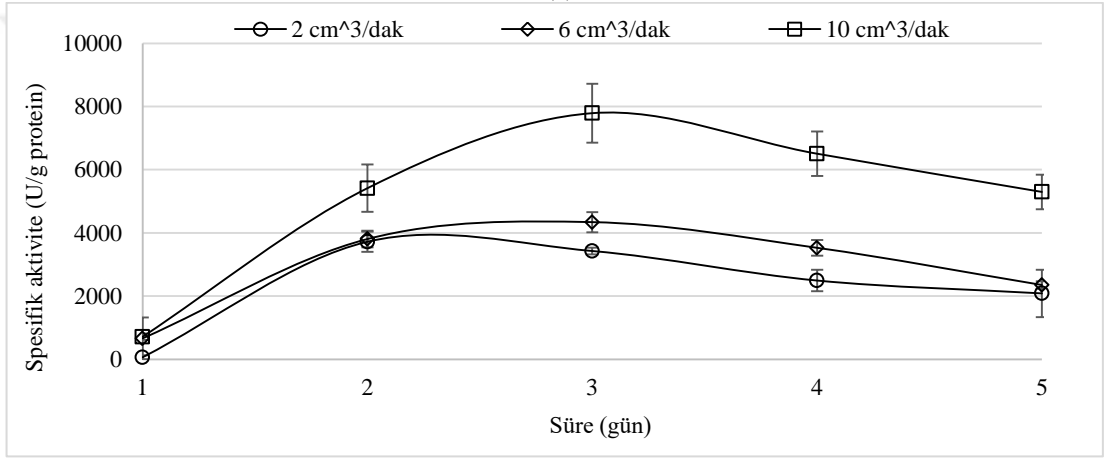


Şekil 4.6. Farklı karıştırma hızlarında gerçekleştirilen fermantasyonlarda biyokütle (g biyokütle/l) değişimi

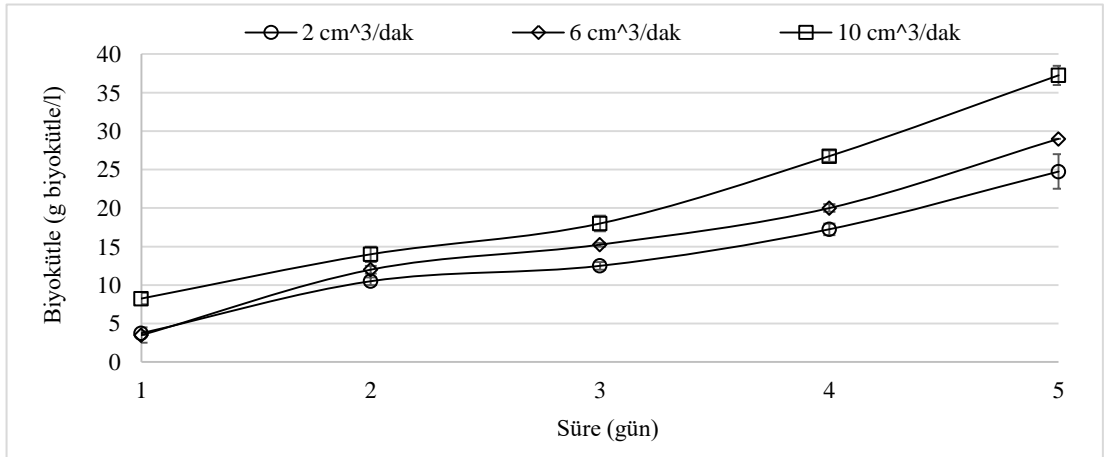
Kontrollü fermantasyon şartlarında ve sabit karıştırma hızında (500 rpm) hava akış hızının mTG üretimine etkisini belirlemek için, 2, 6 ve 10 cm<sup>3</sup>/dak akış hızlarında gerçekleştirilen enzim üretimlerine ait deneysel veriler Çizelge EK-C.3'te verilmiş, hava akış hızına bağlı olarak gözlenen değişimler ise Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Şekil 4.7a incelendiğinde fermantasyonun 1. ve 2. gününde tüm hava akış hızlarında sırası ile ortalama 0.026 ( $\pm 0.020$ ) U/ml ve 0.279 ( $\pm 0.012$ ) U/ml olacak şekilde benzer aktivite değerleri belirlenmiştir ( $p > 0.05$ ). 10 cm<sup>3</sup>/dak hava akış hızında fermantasyonun 3. gününde en yüksek aktivite değeri (0.423 $\pm 0.013$ ) elde edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Hava akış hızının düşürülmesi, fermantasyonun 2. gününden itibaren daha düşük enzim aktivite değerlerinin elde edilmesine sebep olmuştur ( $p < 0.05$ ). Spesifik aktivite değerlerinde ise, enzim aktivitesine benzer bir eğilim elde edilirken, 10 cm<sup>3</sup>/dak hava akış hızında elde edilen değerler 1. günden sonra fermantasyon süresince daha yüksek değerlerde seyretmiştir (Şekil 4.7b). Fermantasyon süresince en yüksek biyokütle üretimi 10 cm<sup>3</sup>/dak hava akış hızında gerçekleştirilen fermantasyonda elde edilmiş olup, 5. günde 37.25 ( $\pm 1.25$ ) g biyokütle/l değerine ulaşmıştır (Şekil 4.7c). Hava akış hızının artışı ile karıştırma etkinliğinde ve mikrobiyal gelişmede meydana gelen iyileşmeler sonucunda biyokütle miktarının artışı bu durumdan olumlu bir şekilde etkilenmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.7. Fermentörde farklı hava akış hızlarının (a) enzim aktivitesine (U/ml) (b) spesifik aktiviteye (U/g protein) ve (c) biyokütle miktarına (g biyokütle/l) etkisi

Sonuç olarak kontrollü fermantasyon şartlarında (pH 6.0) karıştırma (500 rpm) ve havalandırmanın (10 cm<sup>3</sup>/dak) etkisi ile orbital çalkalamalı inkübatörde (150 rpm) ulaşılan enzim aktivitesi değerinden (0.135 U/ml) 3.13 kat daha yüksek bir değer elde edilmiştir.

#### **4.4. Mikrobiyal Stres Faktörlerinin Enzim Üretimine Etkisi**

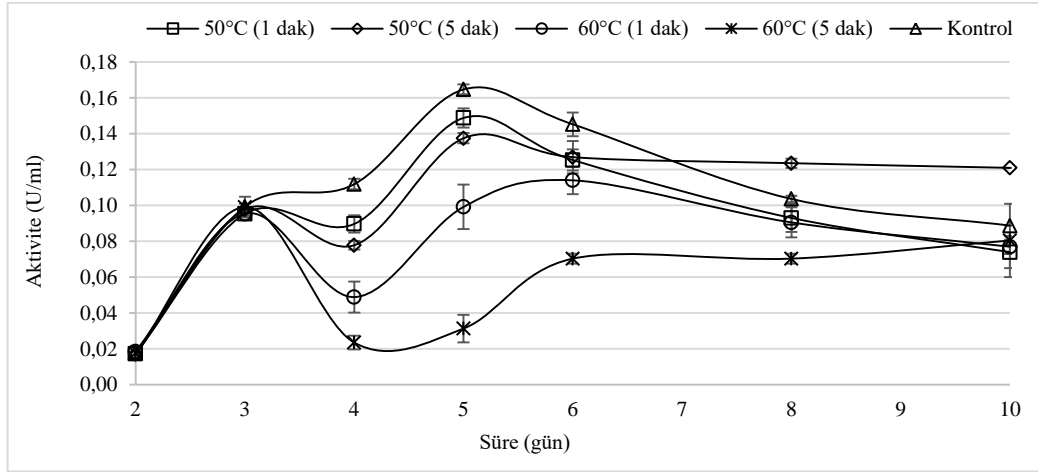
Stres aracılı bir biyoproses biyolojik hedef verimliliğini arttırmak için tasarlanmış bir diğer stratejidir. Besiyeri bileşiminde bulunan karbon, azot veya fosfat gibi kaynakların tükenmesi ile hücre gelişimi kısıtlanır ve bu sayede ikincil metabolitlerin üretimi sağlanabilir. Stres faktörleri göz önünde bulundurularak oluşturulan fermantasyon sistemleri ile istenen metabolitin üretimi artırılabilir. Stres faktörleri arasında, ısıl şok bakteriler gibi biyolojik hücreler için hassas ve yararlı bir uyarıcıdır. Sıcaklık, tuz, alkol ve pH ikincil metabolit üretimini etkileyen önemli beslenme dışı stres faktörleridir. Mikrobiyal TG gibi ikincil metabolit olan antibiyotikler üzerine yapılmış çalışmalarda ısıl şok, alkol ve tuz uygulaması gibi stres faktörlerinin olumlu anlamda etkilediği görülmüştür (Rigali ve ark., 2008). *Streptomyces* türlerinin karmaşık sinyal iletim sistemlerine sahip olduğu bilinmektedir. *Streptomyces* türlerinin farklı stres koşullarına farklı sigma faktörleri ile tepki vermekte ve çevresel şok faktörlerine bağlı olarak bir dizi benzersiz sinyal iletim mekanizmasını devreye sokmaktadır (Kim ve ark., 2008).

##### **4.4.1. Sıcaklık stresi**

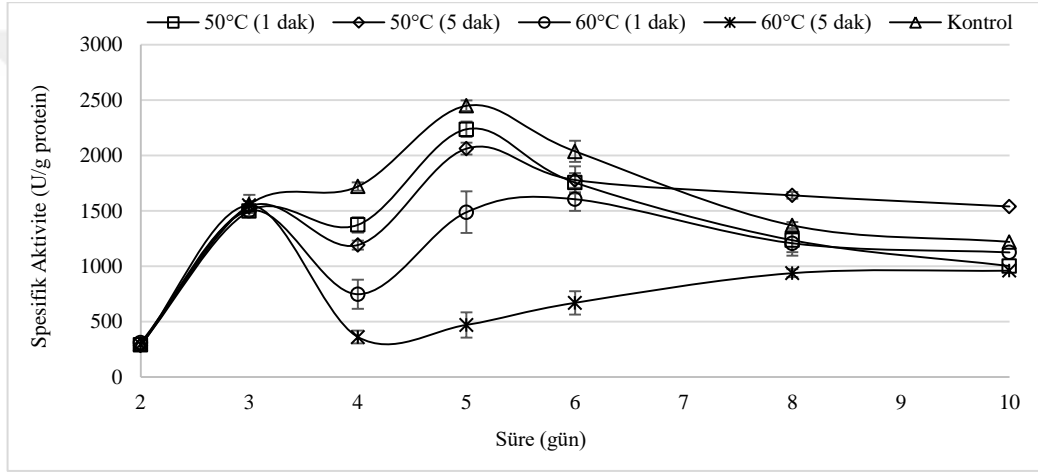
Farklı stres koşullarında ölçülen mTG aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) değerleri ve biyokütle miktarları (g biyokütle/l) Çizelge EK-D.1'de verilmiştir. İnkübasyonun 3. gününde farklı sıcaklıklarda (50 ve 60°C) ve sürelerde (1 ve 5 dak) kültür ortamına uygulanan sıcaklık stresinin, enzim aktivitesinde sıcaklık uygulanmayan (kontrol) örneğe göre artış sağlamadığı belirlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesi değerine (0.165 U/ml) sıcaklık stresi uygulanmayan kontrol örneğinde inkübasyonun 5. gününde ulaşılmıştır. Sıcaklık uygulamasına maruz kalan örneklerde inkübasyonun 3. gününden sonra aktiviteleri ısıl işlemin şiddeti ile orantılı olarak hızlı bir şekilde düşmüştür. Özellikle 50°C'de 1 ve 5 dakikalık ısı uygulamasında aktivitenin daha iyi korunduğu ve inkübasyonun 5. gününde maksimum değere (1 dak: 0.15 U/ml ve 5 dak:

0.14 U/ml) ulaştığı belirlenmiştir. Diğer taraftan 60°C sıcaklık uygulamasında örneklerin 5. günden sonra maksimum değere ulaştığı görülmüştür (şekil 4.8a). İnkübasyon ortamına farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan stresin örneklerin spesifik aktivite değerleri üzerindeki etkisi şekil 4.8b'de incelendiğinde, enzim aktivitesinde meydana gelen değişimlere benzer bir etki gösterdiği görülmektedir. Sıcaklık stresi uygulamaları kültür ortamında diğer proteinlerin sentezi üzerinde anlamlı bir etki yapmamasından dolayı spesifik aktivitelerde benzer bir davranış gözlemlenmiştir. Bazı mikroorganizmaların sıcaklık stresine bağlı olarak stres proteinlerini sentez eğiliminde olduğu bilinmektedir. Bu durum özellikle mikroorganizmaların doğada stres koşullarına karşı adaptasyonundan kaynaklanmaktadır (Völker ve ark., 1992). Mikrobiyal TG enziminin sıcaklık şoklarına karşı stres proteini olarak sentez edilmesi durumunda enzim aktivitesinde bir artışın beklenmesi söz konusu olabilmektedir (Zhang ve ark., 2012b). Sıcaklık stresinin inkübasyon süresince kültür ortamındaki biyokütle miktarı üzerindeki etkisi incelendiğinde, özellikle 60°C'de 5 dakikalık sıcaklık uygulaması sonucu kültürlerin inkübasyonun 3. günden sonra biyokütle miktarlarındaki artışın daha düşük olduğu görülmektedir. Sıcaklık stresi uygulanan örneklerin inkübasyon sonunda kültür ortamında biyokütle miktarlarındaki artışın kontrol örneğine göre daha düşük kaldığı belirlenmiştir (şekil 4.8c).

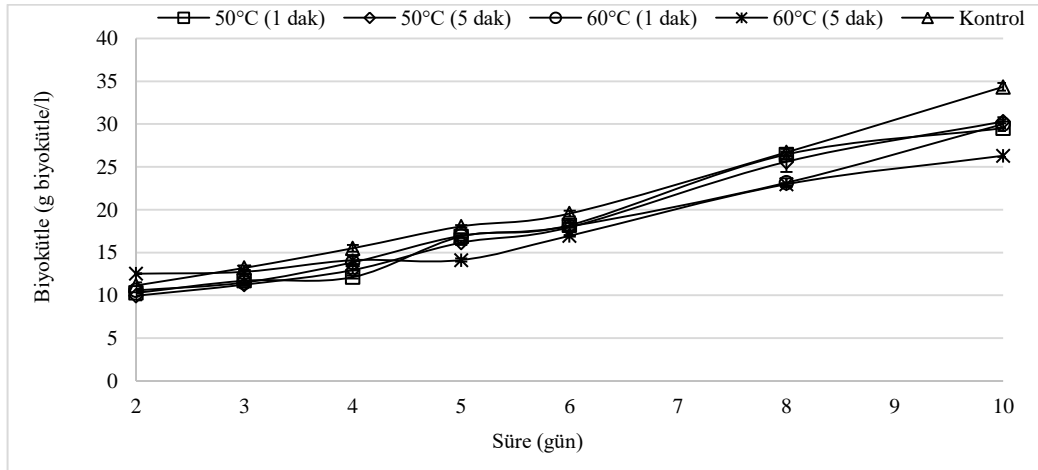




(a)



(b)



(c)

Şekil 4.8. Farklı süre (1-5 dak) ve sıcaklıklarda (50-60°C) uygulanan stresin (a) enzim aktivitesine (U/ml) (b) spesifik aktiviteye (U/g protein) ve (c) biyokütle miktarına (g biyokütle/l) etkisi

Isıl şok uygulamasının enzimlerin üretimine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, *S. mobaraensis* DSM40587 türü ile mTG üretiminde fermantasyonun 0., 24., 48. ve 72. saatlerinde ısı şok uygulaması için kültürler 50, 60 ve 70°C sıcaklıklarda 1 dakika su banyosunda tutulmuş ve sıcaklık hızlı bir şekilde 30°C'ye düşürülerek 96 saat sonunda enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Sonuçta, inkübasyonun 48. saatinde uygulanan 60°C'deki ısı şok (1 dak) ile kontrole göre en yüksek enzim aktivitesine (1.16 U/ml) ulaşılmıştır. Ayrıca yüksek sıcaklık uygulamasının (60 ve 70°C) hücre gelişimini ve protein sentezini yavaşlattığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, ısı şok uygulamalarının mikrobiyal gelişme evresi tamamlandıktan sonra uygulanmasının etkili olduğunu bildirmişlerdir (Zhang ve ark., 2012b). Ngo ve ark. (2005) ısı işleminin *S. griseus* fermantasyonunda hücre büyümesini ve kitosanaz enzim üretimini etkilediğini belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada ısı şok uygulanması sonucunda, *S. griseus*'un hücre büyümesinde 1.2 kat ve kitosanaz aktivitesinde ise 1.8 kat bir artış elde etmişlerdir.

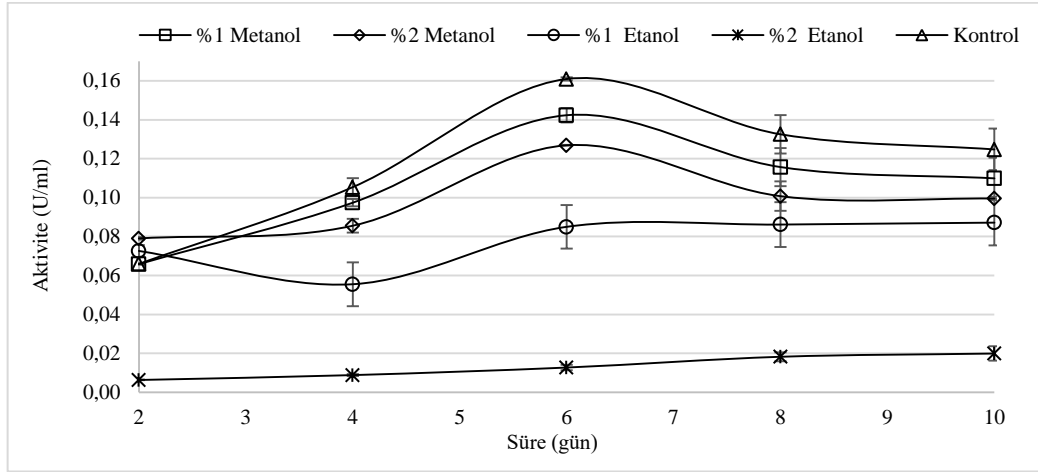
#### 4.4.2. Alkol stresi

İnkübasyondan önce GNB besiyerine %1 ve %2 oranlarında ilave edilen etanol ve metanolün *S. mobaraensis* kültürünün mTG enzim üretimine etkileri incelenmiş ve sonuçlar Çizelge EK-D.2'de verilmiştir. Ortama farklı konsantrasyonlarda etanol ve metanol ilavesi enzim aktivitesinde bir artış sağlayamamıştır. Her iki alkol için de artan konsantrasyonlar aktivitede daha çok kayıplara sebep olmuştur. Diğer taraftan %1 konsantrasyondaki etanolün inkübasyonun 4. ve 6. günlerinde, %2 konsantrasyondaki etanolün ise tüm inkübasyon sürelerinde metanole oranla aktivitede meydana getirdiği kayıp daha yüksek düzeylerde gerçekleşmiştir ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.9a). Örneklerin spesifik aktivite değerleri incelendiğinde kontrol örneğinin inkübasyonun 6. gününde en yüksek spesifik aktiviteye ulaştığı ( $2267\pm 25$  U/g protein), 6. günde en yüksek aktiviteye ulaşan %1 ve %2 oranlarında metanol ilave edilmiş örneklerin ise spesifik aktivite değerlerinin kontrole göre daha düşük düzeyde kaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.9b). Farklı oranlarda etanol ve metanol ilave edilmiş besiyerinde inkübe edilen *S. mobaraensis*'in gelişme süresince protein biyosentezinde meydana gelen değişimlerin mTG enzim sentezini olumlu anlamda etkilemediği için örnekler arasındaki spesifik aktivite

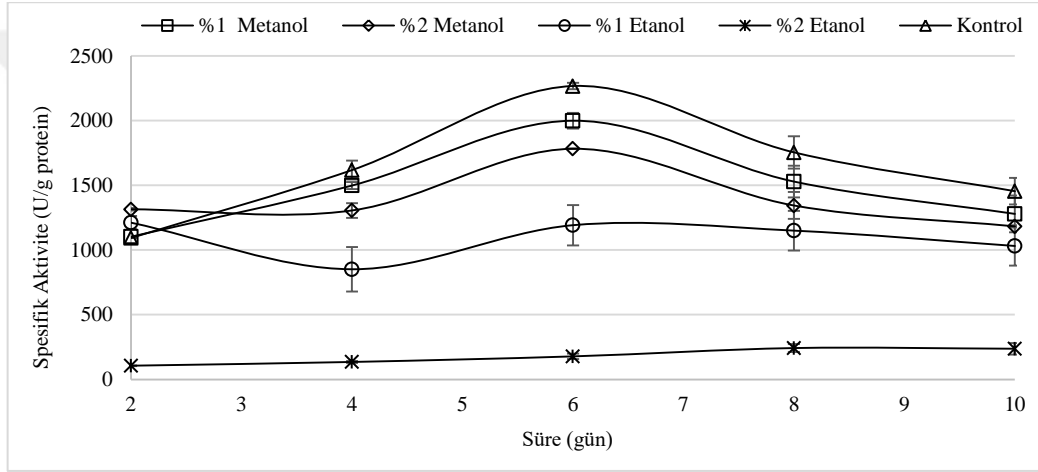
değerlerindeki değişimler, enzim aktivitesinde elde edilen sonuçlar ile benzer bir davranış göstermiştir.

Tüm etanol konsantrasyonlarının hücre gelişimini ve biyokütle üretimini kontrol örneğine göre önemli ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir. Özellikle %2 etanol konsantrasyonlarında inkübasyonun tüm sürelerinde elde edilen biyokütle değerleri önemli ölçüde düşük kalmış ve inkübasyon bitiminde ancak 12.30 g biyokütle/l seviyesine ulaşabilmiştir (Şekil 4.9c). Bu durum artan etanol konsantrasyonunun mikrobiyal gelişmeyi ve biyokütle üretimini baskılayarak mTG enzim aktivitesini olumsuz etkilediğini göstermektedir. Kültür ortamına %2 metanol ilave edilmesi ile inkübasyonun 4., 6. ve 8. günlerinde elde edilen biyokütle miktarlarının, %1 metanol ilave edilen örneklere kıyasla daha yüksek ( $p<0.05$ ) bulunmasına rağmen, enzim aktivite değerlerinin daha düşük olduğu saptanmıştır.

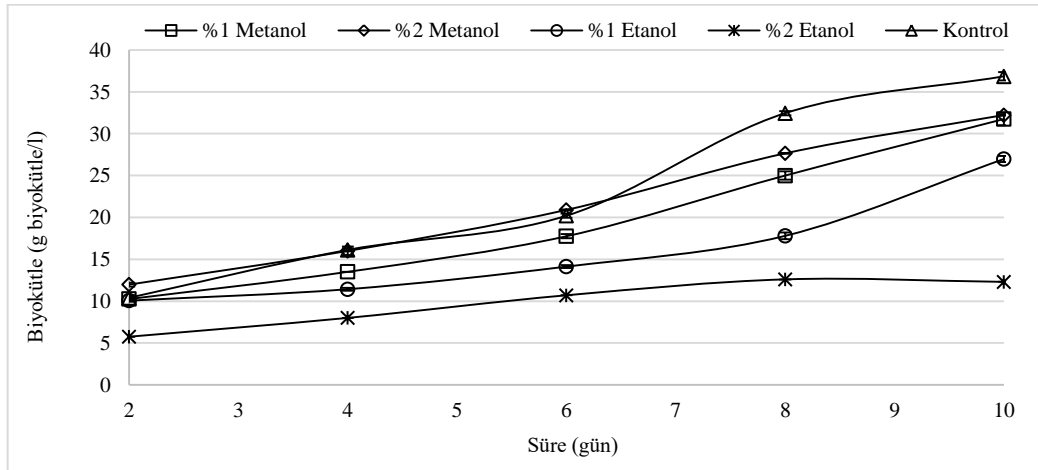
Ancak yapılan bazı çalışmalarda antibiyotikler ve bazı enzimler için alkol stresinin üretimde bir artış yapabileceği belirtilmektedir. Zhang ve ark. (2012b) farklı alkollerin mTG üretimine etkilerini belirlemek için kültürlerle fermantasyonun başlangıcında %1, 2 ve 3 oranlarında etanol ve metanol ilave etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda uygulanan alkol stresinin mTG aktivitesini kontrol örneğine (0.73 U/ml) göre arttırarak; %1 metanol uygulaması ile 1.76 U/ml'ye, %1 etanol uygulaması ile 1.47 U/ml'ye yükseltmişlerdir. Fernández ve ark. (1999) metanol veya etanol varlığında *S. clavuligerus* NP1'in gelişiminin ve durgun fazda hücreler tarafından sentezlenen sefalosporin üretiminde belirgin bir artışın olduğunu bulmuşlardır. Haq ve ark. (2003) metabolitlerin sentezinde alkollerin uyarıcı etkilerini inceledikleri bir çalışmada, %1.0 (v/v)'lik metanolün, *Aspergillus niger* GCB-47'in sitrik asit üretimini kontrol örneğine göre 1.96 kat yükselttiğini belirlemişlerdir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.9. Besiyerine farklı oranlarda etanol ve metanol ilavesinin (a) enzim aktivitesine (U/ml) (b) spesifik aktiviteye (U/g protein) ve (c) biyokütle miktarına (g biyokütle/l) etkisi

#### 4.4.3. Tuz ve kimyasal stresi

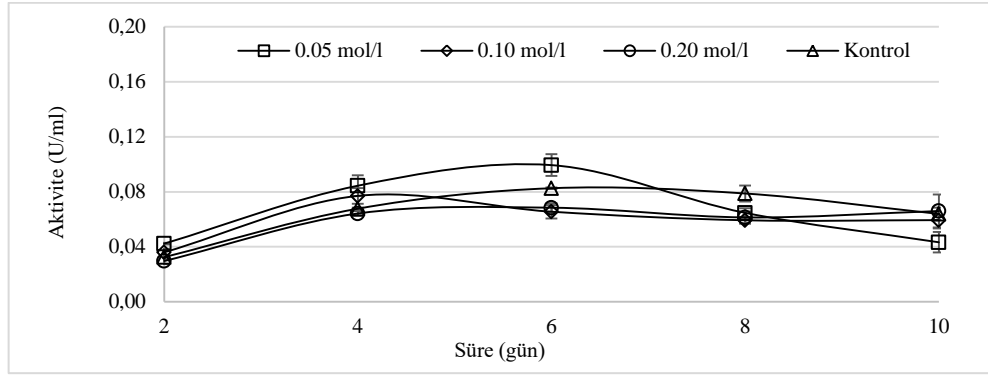
Tuz stresi, *Streptomyces* türlerinde SigB, SigN ve SigH benzeri genel stres cevabı proteinlerinin sentezini ve bazı bakterilerde sekonder metabolitleri uyaran önemli bir faktördür (Novotna ve ark., 2003; Wang ve ark., 2010). Kimyasal stres için 0.05, 0.10 ve 0.20 mol/l NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl ve Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> GNB besiyerine ilave edilmiş ve inkübasyon süresince kültür ortamında enzim aktiviteleri, spesifik aktiviteleri ve biyokütle miktarları belirlenmiştir (Çizelge EK-D.3). İnkübasyon süresince tüm tuzların farklı günlerde mTG aktivitesinde artış sağladığı belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). 0.1 mol/l MgCl<sub>2</sub> ve 0.05 mol/l Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tuzlarında kontrol örneğine göre enzim aktivitesinde yaklaşık 2 katlık bir artış sağlanmıştır. 0.2 mol/l KCl ve 0.05 mol/l NaCl ilave edilen kültür ortamında ise enzim aktivitesinde yaklaşık 1.20 katlık bir artış elde edilmiştir (Şekil 4.10).

Besiyerine 0.05 mol/l NaCl ilave edilmesi tuz ilave edilmeyen kontrol örneği ile inkübasyon süresince benzer biyokütle artışı (Şekil 4.11) gösterirken enzim aktivitesi bakımından 6. günde daha yüksek değerlere (0.099 U/ml) ulaştığı belirlenmiştir. Bu durum düşük NaCl konsantrasyonunun mikrobiyal gelişme ve biyokütle sentezinde bir değişim meydana getirmedeği ancak mTG enzim sentezinde ufak bir artış oluşturduğunu göstermiştir. Diğer taraftan daha yüksek NaCl konsantrasyonlarında biyokütle miktarları ve 6. gün enzim aktivite değerlerinin 0.05 mol/l tuz konsantrasyonuna kıyasla daha düşük düzeylerde olduğu belirlenmiştir. KCl tuzu ile oluşturulan stres şartlarında ise NaCl ile elde edilen artışa benzer oranda bir aktivite artışı sağlanmıştır. 0.2 mol/l KCl konsantrasyonunda inkübasyonun 10. gününde en yüksek aktiviteye (0.152±0.003 U/ml) ulaşılarak, kontrole göre (0.126± 0.003 U/ml) artış sağlanmıştır ( $p<0.05$ ).

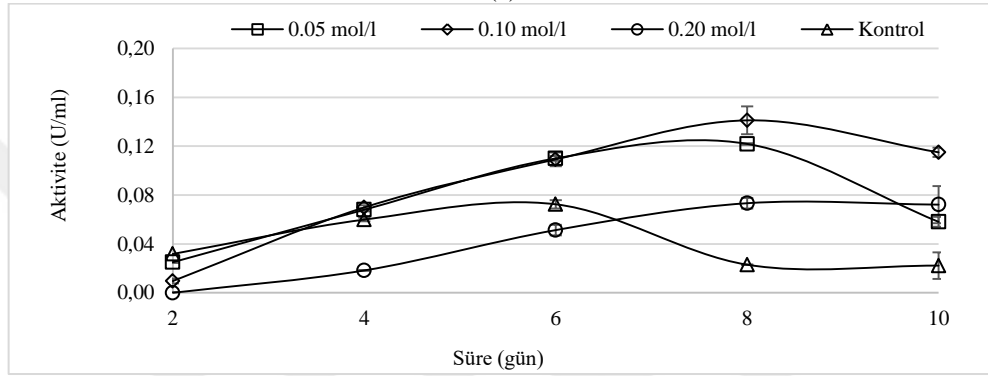
0.05 ve 0.1 mol/l oranlarında MgCl<sub>2</sub> ilave edilen kültür ortamında inkübasyonun 8. gününe kadar aktivitede artış meydana gelmiş ve en yüksek enzim aktivitesi değerlerine ulaşılmıştır. 0.1 mol/l MgCl<sub>2</sub> ilave edilen örneğin 8. günde ulaştığı aktivite değeri (0.14 U/ml) kontrol örneğinin 6. günde ulaştığı en yüksek enzim aktivitesi (0.072 U/ml) ile kıyaslandığında yaklaşık 2 katlık bir artışın sağlandığı belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Ayrıca 0.05 mol/l MgCl<sub>2</sub> ilave edilen örnekte inkübasyonun 8. gününde aktivitede kontrole

göre yaklaşık 1.7 katlık bir artış meydana geldiği görülmüştür ( $p<0.05$ ). Yüksek  $MgCl_2$  konsantrasyonunda ise (0.2 mol/l) inkübasyonun tüm sürelerinde artan enzim aktivitesi 10. günde en yüksek düzeye (0.072 U/ml) ulaşmış, ancak kontrol örneği ile benzer aktivite sonucu vermiştir ( $p>0.05$ ).  $MgCl_2$  ilave edilen kültürlerin inkübasyon süresince biyokütle miktarlarındaki değişim incelendiğinde 0.2 mol/l  $MgCl_2$  ilave edilen örneğin biyokütle miktarında ilk 8 gün daha yavaş bir artışın meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.11). Yüksek tuz konsantrasyonunun mikrobiyal gelişmeyi ve biyokütle sentezini etkilediği belirlenmiştir.

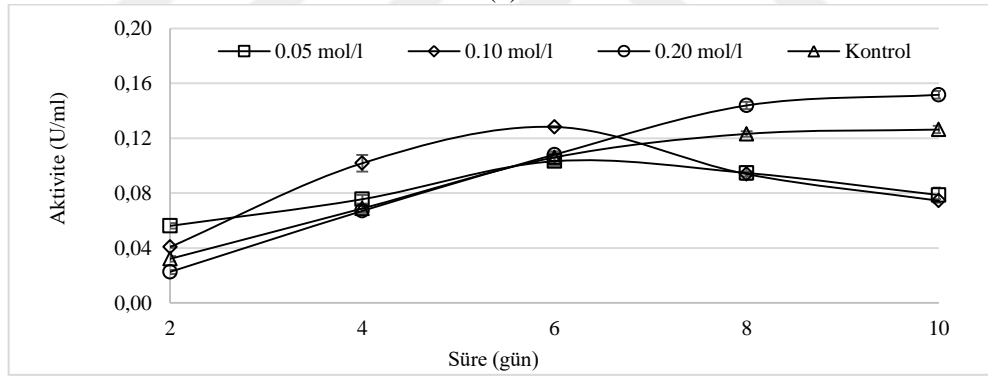
Düşük  $Na_2SO_4$  konsantrasyonunda (0.05 mol/l) elde edilen enzim aktivite değerleri inkübasyonun 10. gününe kadar en yüksek düzeylerde gerçekleşmiş olup, inkübasyonun 8. gününde (0.16 U/ml) kontrol örneğinin 6. günde ulaştığı maksimum aktivite değerine (0.085 U/ml) kıyasla yaklaşık 1.9 katlık bir artış sağlanmıştır (Şekil 4.10). 0.1 mol/l  $Na_2SO_4$  konsantrasyonunda ise inkübasyonun 8. gününe kadar kontrol örneği ile benzer aktivite değeri veren örnek inkübasyonun 8. gününde aktivite değerleri artmaya devam etmiş ve kontrol örneğinin ulaştığı maksimum değerin üzerine çıkmıştır. Benzer şekilde 0.2 mol/l  $Na_2SO_4$  ilave edilen kültür ise inkübasyonun 6. gününde kontrole göre benzer aktivite sonucu verirken ( $p>0.05$ ), ilerleyen sürelerde aktivite artışı devam ederek en yüksek düzeyine (0.14 U/ml) ulaşmıştır. Yüksek  $Na_2SO_4$  konsantrasyonlarında (0.1 ve 0.2 mol/l) inkübasyonun 10. gününe kadar elde edilen biyokütle miktarlarındaki artış daha yavaş gerçekleşirken, 0.05 mol/l ve kontrol örneğindeki artış daha hızlı gerçekleşmiştir (Şekil 4.11). Burada da yüksek tuz konsantrasyonlarının mikrobiyal gelişme ve biyokütle üretimi üzerinde bir miktar baskısı olduğu gözlenmiştir.



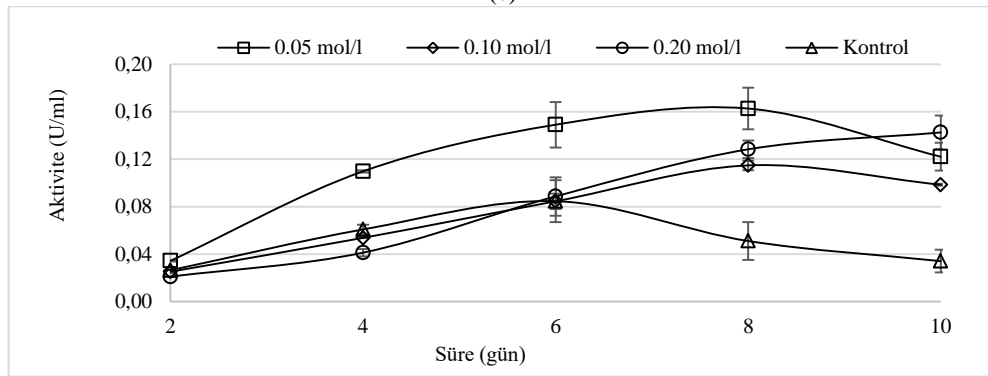
(a)



(b)

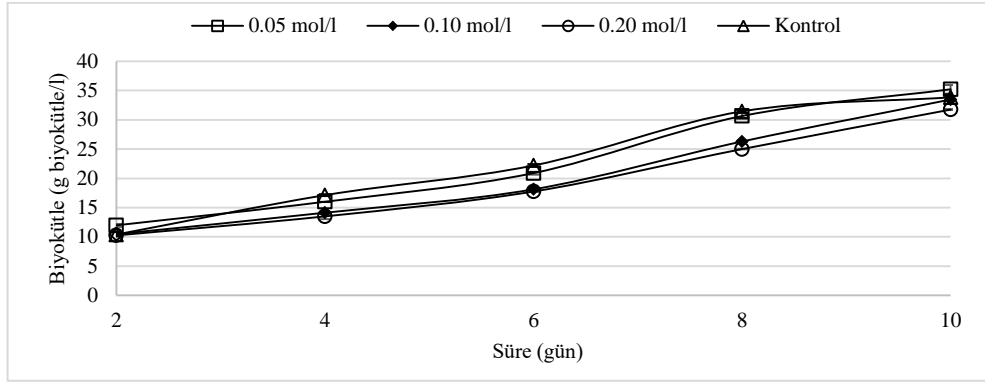


(c)

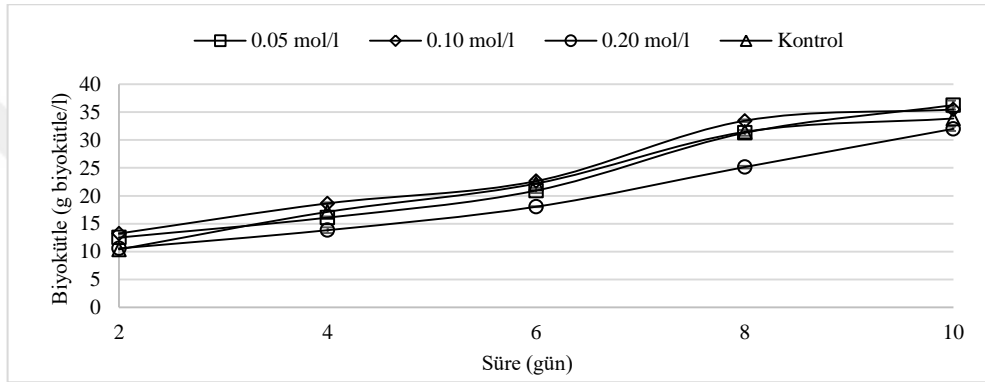


(d)

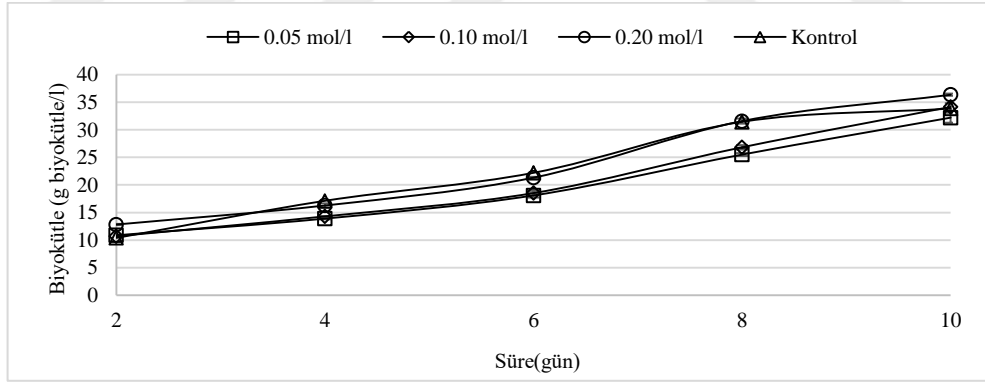
Şekil 4.10. Farklı tuz streslerinin mTG aktivitesine etkisi (a) NaCl, (b) MgCl<sub>2</sub>, (c) KCl, (d) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



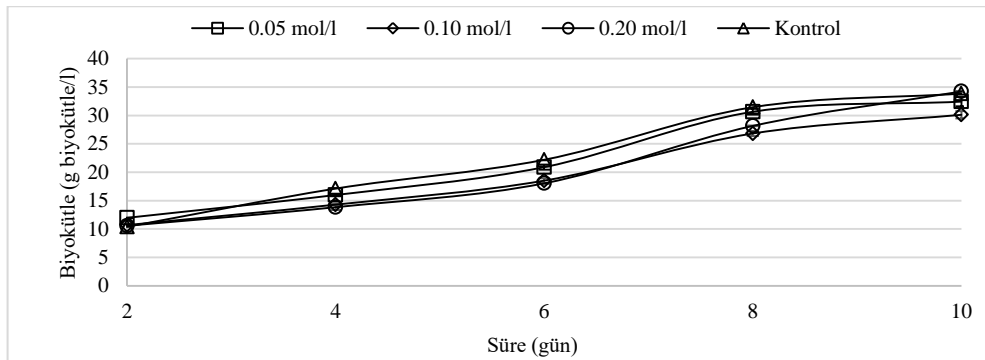
(a)



(b)



(c)



(d)

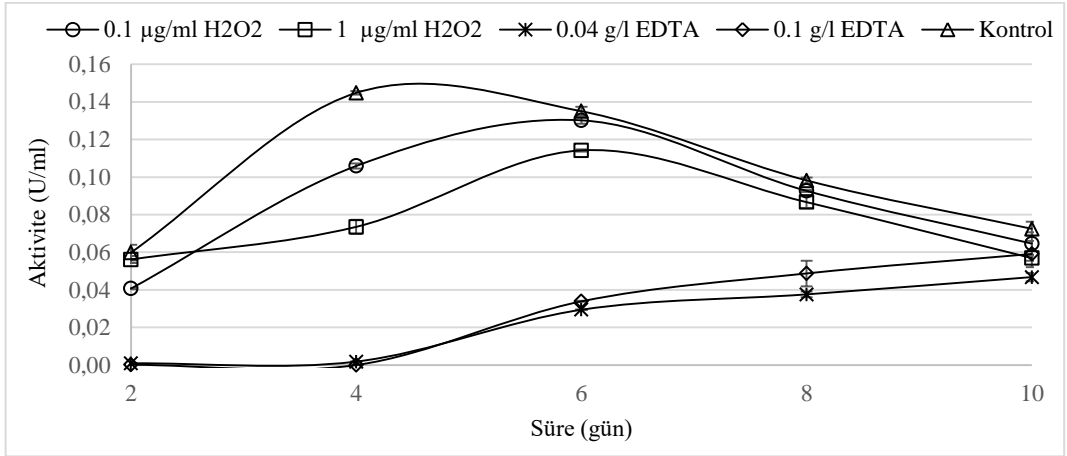
Şekil 4.11. Farklı tuz streslerinin biyokütle miktarına etkisi (a) NaCl, (b) MgCl<sub>2</sub>, (c) KCl, (d) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



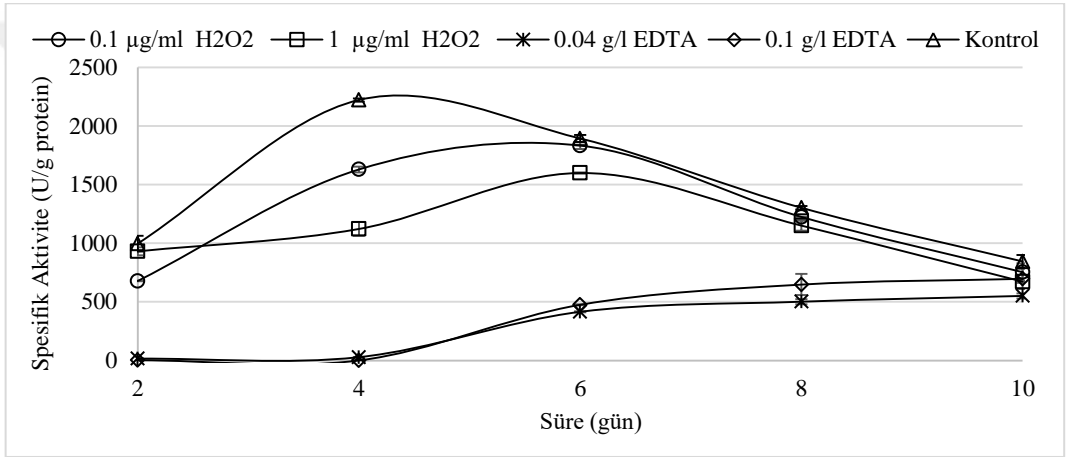
Tuzlar tarafından oluşturulan stres şartları özellikle bakterilerde ikincil metabolitlerin sentezini uyaran regüle edici proteinlerin aktivasyonunda rol oynayarak enzim sentezinde artış sağlayabilmektedir. Diğer taraftan bu gibi stres ortamlarının mikrobiyal gelişmeyi baskıladığı da bilinmektedir (Zhang ve ark., 2012b). *Streptomyces* türleri tarafından öncül enzimler (pro-mTG) olarak sentezlenen mTG enziminin aktifleştirilmesi amacı ile sentezlenen proteaz enzimleri de tuz stresi altında kontrol edilebilmektedir (Zhang ve ark., 2012b). Zhang ve ark. (2012a) farklı NaCl konsantrasyonları ile yaptıkları çalışmada 0.2 mol/l başlangıç tuz konsantrasyonunda 2.4 kat aktivite artışı sağlamışlardır. Araştırmanın bir sonraki aşamasında sekiz farklı tuz (MgCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COONa ve CaCl<sub>2</sub>) 0.2 mol/l konsantrasyonunda besiyerine ilave edilmiş ve bu tuzların aktivite üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmada en yüksek mTG aktivitesi artışı MgCl<sub>2</sub> varlığında belirlenmiştir. CaCl<sub>2</sub> ve CH<sub>3</sub>COONa varlığında ise mTG üretiminin neredeyse sonlandığı belirlenmiştir. Nakata ve ark. (1999) ve Himabindu ve ark. (2007) mikroorganizmalardan antibiyotik üretimleri ile yaptıkları çalışmalarda NaCl stresinin bazı antibiyotiklerin sentezinde artış yaptığını bulmuşlardır. Gabdrakhmanova ve ark. (2005) *Bacillus intermedius* türüne tuz stresinin etkilerini araştırdıkları çalışmada, 1.0-2.5 M NaCl, KCl veya disodyum süksinat içeren besiyerinde büyüme sırasında tuz baskısının glutamil endopeptidaz enziminin sentezinde artışa yol açtığını belirlemişlerdir.

Bakteriyel hücrelerin oksidatif strese verdiği yanıtlar çoğunlukla *Escherichia coli* ve *Salmonella Typhimurium*'da çalışılmıştır. *Escherichia coli*'de birçok oksidatif savunma proteinleri ve genleri bulunmuştur. Bu proteinler ve enzimler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya serbest radikallerin neden olduğu DNA hasarını onarabilmekte, hücreleri lipid peroksidasyonu gibi zarara karşı koruyabilmektedir. Oksidatif hasarı önlemek veya onarmak için bu tür savunma mekanizmalarının evrimi, aerobik yaşam formlarının hayatta kalması için kritik öneme sahiptir. Hücelere düşük dozlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya radikal üreten oksitleyicilere maruz bırakmak savunma proteinlerinin uyarılmasını sağlamaktadır (Lee ve ark., 1993). Benzer mekanizmaların mTG enziminin veya pro-mTG aktifleştirilmesinde görevli proteolitik enzimlerin sentezinin uyarılması için de geçerli olabileceği düşünülmektedir.

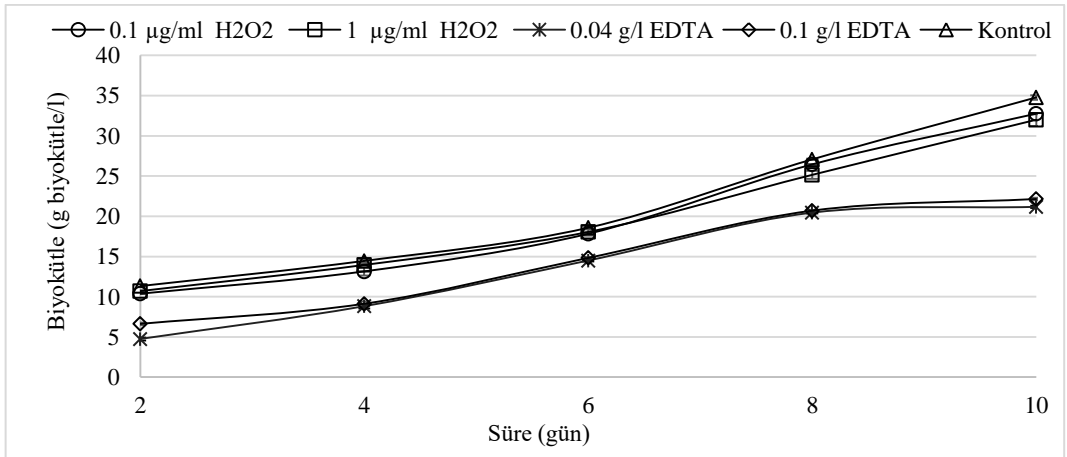
Kimyasal stres için farklı konsantrasyonlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve EDTA ilave edilmiş kültür ortamında enzim aktivitesi kontrol örneğinden daha düşük olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12a). Özellikle EDTA kimyasalının antimikrobiyal etkisinden dolayı enzim üretimi de olumsuz etkilenmiştir (Şekil 4.12c). Kontrol örneği en yüksek enzim aktivitesi değerine (0.145 U/ml) inkübasyonun 4. gününde ulaşırken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilen kültür ortamında en yüksek enzim aktivite değerleri 0.1 µg/ml ve 1 µg/ml için inkübasyonun 6. gününde sırası ile 0.130 U/ml ve 0.114 U/ml olarak gerçekleşmiş ve kontrole göre daha düşük düzeyde kalmıştır ( $p<0.05$ ). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun artışı mikrobiyal gelişme ve biyokütle miktarında inkübasyonun 8. gününe kadar önemli bir farklılık meydana getirmezken (Şekil 4.12c), enzim aktivitesi açısından 0.1 µg/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye kıyasla daha düşük değerler ile sonuçlanmasına sebep olmuştur (Şekil 4.12a). Diğer taraftan besiyeri ortamına farklı konsantrasyonlarda EDTA ilavesi inkübasyon süresince biyokütle miktarlarında anlamlı bir düşüşe sebep olurken, enzim aktivite değerlerinde de önemli bir azalma gözlemlenmesine sebep olmuştur. EDTA gibi şelatlaştırıcı özellikteki kimyasalların besiyerinde bulunan bazı mineralleri bağlayarak gerek mikroorganizmalar tarafından kullanımını engellemesi gerekse bazı enzimlerin (pro-mTG aktifleştirici) metal kofaktörlerinin bloke olmasından dolayı aktivitede ve biyokütle miktarlarında azalmaya sebep olduğu düşünülmektedir. Lee ve ark. (1993) yaptıkları bir çalışmada, *Streptomyces coelicolor* türünün 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilmiş kültür ortamında farklı oksidatif savunma enzimlerinin aktivitelerindeki değişimleri incelemişler ve peroksidaz enziminde 2-4 kat, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminde %60, glutation reduktaz enziminde ise %80'lik bir aktivite artışı sağlandığını bildirmişlerdir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.12. EDTA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilavesinin (a) enzim aktivitesine (U/ml) (b) spesifik aktiviteye (U/g protein) ve (c) biyokütle miktarına (g biyokütle/l) etkisi

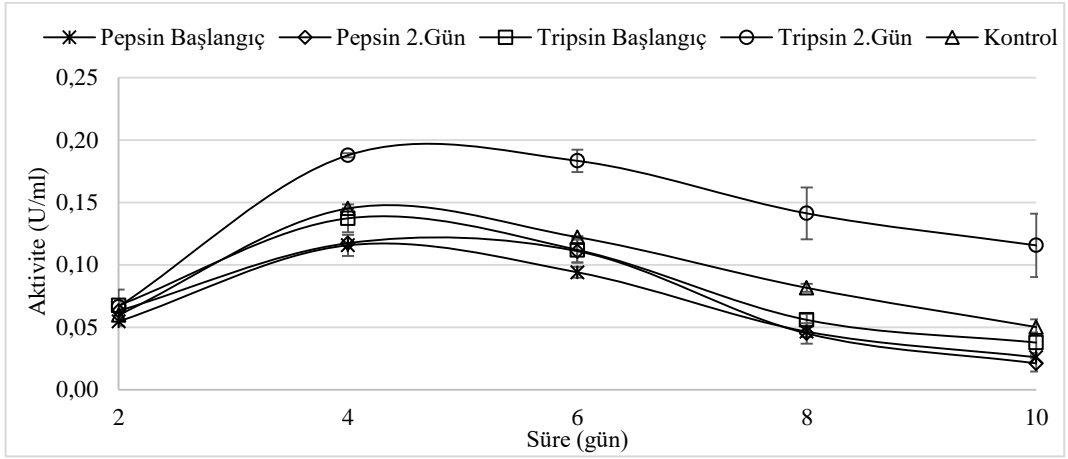
#### 4.4.4. Proteolitik enzim stresi

TG enzimi tarafından proteinlerde oluşturulan izopeptid bağlarının organizmada fizyolojik önemi bulunmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından hücrede oluşturulan çapraz bağlanmış yapılar özellikle dış enzimlere karşı oldukça sağlam olup, hidrolizasyona karşı korunmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmalar tarafından sentezlenen kılıf, hücre duvarı ve çekirdek proteinleri gibi yapıların ekzojen proteolitik enzimlere karşı korunmasında TG enziminin önemli bir fonksiyonu olabilmektedir (Mehta ve Eckert, 2005). Diğer taraftan mTG enziminin organizma tarafından öncül formda (zimojen pro-mTG) sentezlenmesi, enzimin aktive edilmesinde organizmanın sentezlediği endoproteazlara ihtiyaç duymaktadır. In vitro şartlarda yapılan çalışmalarda özellikle sığır tripsini, intestinal kimotripsin gibi bazı enzimler tarafından inaktif mTG enziminin aktive edilmesi gerçekleştirilmektedir (Zotzel ve ark., 2003).

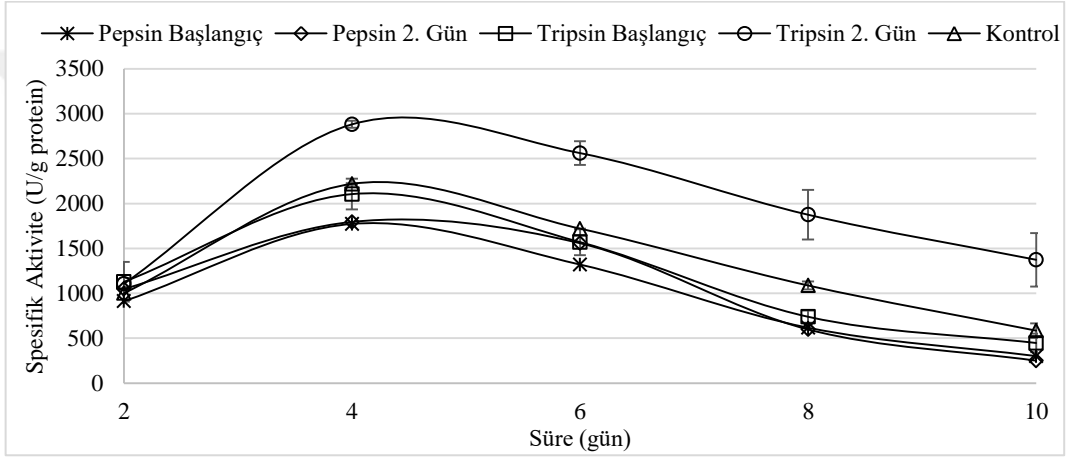
Farklı enzim stres koşullarında ölçülen mTG aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) değerleri ve biyokütle miktarları (g biyokütle/l) Çizelge EK-D.5’de verilmiştir. Tripsin enzim solüsyonunun inkübasyonun 2. gününde besiyerine ilave edilmesi ile kontrol örneğine göre enzim aktivitesinde önemli bir artış (1.29 kat) sağlanmıştır (Şekil 4.13a). Diğer taraftan pepsin enzimi ilavesi ise aktivitede düşüşe sebep olmuştur. Tüm örnekler inkübasyonun 4. gününde en yüksek enzim aktivitesi değerlerine ulaşmışlardır. Tripsin (2.gün) ilave edilen örneklerin inkübasyonun 4., 6., 8. ve 10. günlerinde ulaştığı enzim aktivite değerleri diğer örneklerle kıyasla daha yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Kontrol örneğinde inkübasyonun 4. gününde ulaşılan en yüksek aktivite değeri (0.145 U/ml) pepsin ilave edilen örneklerde ulaşılan en yüksek aktivite değerinden daha yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Tripsin (başlangıç) örneğinde ise inkübasyonun 4. gününde kontrol örneğinde ulaşılan aktivite değeri ile benzer sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.13a). Enzim ilave edilen örneklerde inkübasyon süresince biyokütle miktarlarında önemli bir farklılık meydana gelmediği ve inkübasyonun bitiminde kontrol örneğinin biyokütle miktarında enzim ilave edilen örneklerle kıyasla daha fazla bir yükselmenin meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 4.13c). Ortama ilave edilen proteolitik enzimlerin kültür ortamında mTG enzim aktivitesi dışında diğer proteinlerin sentezinde anlamlı bir etki oluşturmadığı bu yüzden spesifik aktivitesi değerlerinin enzim aktivite değerlerinde olduğu gibi benzer davranış sergilediği gözlenmiştir (Şekil

4.13b). Sonuç olarak özellikle inkübasyonun 2. gününde kültür ortamına tripsin enzimi ilavesi ile mTG aktivitesinde kontrol örneğine göre meydana gelen artışın, proteolitik enzimlerin öncül pro-TG enzimini aktiveştirilmesi veya hücrenin kendini koruma mekanizması kapsamında olduğu düşünölmektedir.

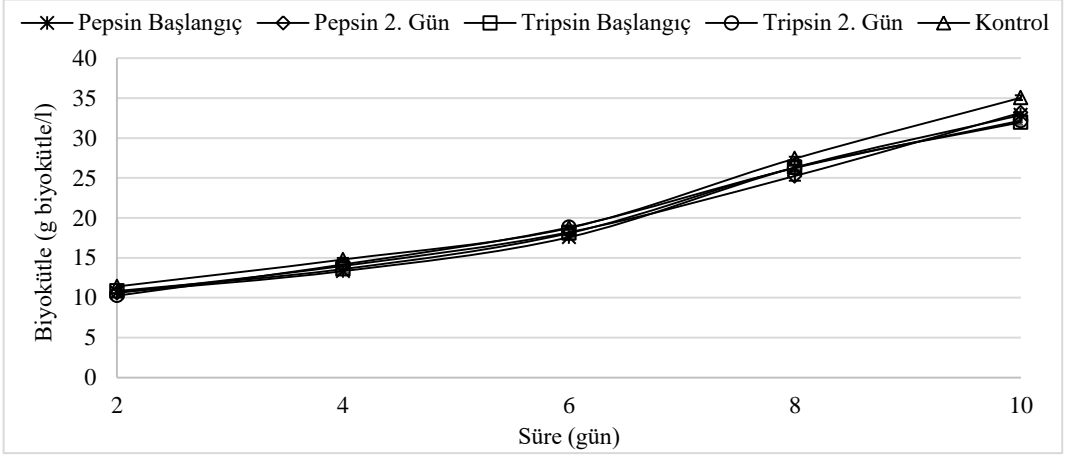




(a)



(b)



(c)

Şekil 4.13. Pepsin ve tripsin enzimlerinin (a) enzim aktivitesine (U/ml) (b) spesifik aktiviteye (U/g protein) ve (c) biyokütle miktarına (g biyokütle/l) etkisi

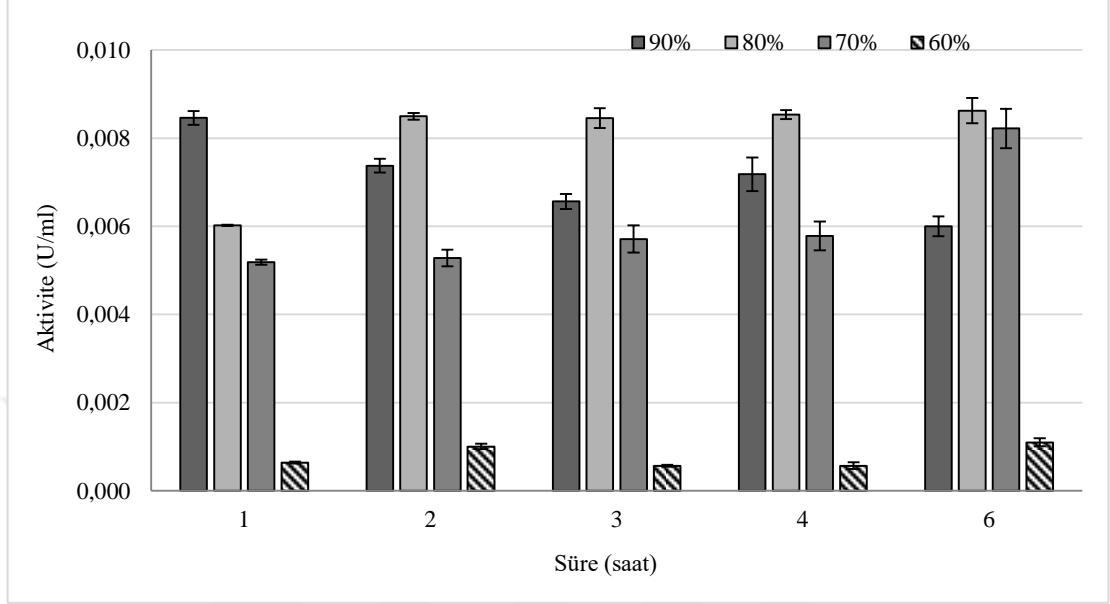
#### 4.5. Mikrobiyal TG Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Kültür ortamında üretilen mTG enziminin kısmi saflaştırma şartlarının belirlenebilmesi için farklı parametrelerde (süre, tuz-alkol konsantrasyonu) gerçekleştirilen çöktürmeler sonrası enzim aktivitesinde meydana gelen değişimlere ait deneysel sonuçlar EK-E'de verilmiştir. Tuzla çöktürme (deriştirme) işlem koşullarının belirlenmesi amacıyla süre, tuz doygunlukları ve alkol konsantrasyonları değiştirilerek gerçekleştirilen işlemlerde, aktivitenin korunduğu ve en iyi saflaştırma etkinliğinin sağlandığı şartların belirlenmesi hedeflenmiştir. Enzimlerin saflaştırılmasında ilk basamağı oluşturan çöktürme işlemlerinden (tuz, alkol, izoelektrik çöktürme vb.) enzimler için en elverişli olanın amonyum sülfat çöktürme tekniği olduğu bilinmektedir (Cui ve ark., 2007).

##### 4.5.1. Amonyum sülfat $[(NH_4)_2SO_4]$ ile çöktürme

Farklı tuz doygunluk derecelerinde ve sürelerde gerçekleştirilen çöktürme işlemlerinde, %90 tuz doygunluğunda çöktürme süresi arttıkça (4. saat hariç) enzim aktivitesinde önemli bir azalma meydana gelirken, diğer tuz doygunluklarında (%80, 70 ve 60) bekleme süresi arttıkça aktivitedeki kaybın daha az olduğu veya hiç olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.14 ve Çizelge 4.1). Özellikle %80 doygunlukta gerçekleştirilen çöktürme işleminde 1 saatlik uygulamada aktivitedeki kayıp (%37.12) çöktürme etkinliğindeki yetersizlik sebebiyle fazla gerçekleşirken diğer sürelerde (2, 3, 4 ve 6 saat) aktivite büyük oranda korunmuş ve benzer verim sonuçları (~%94 verim) elde edilmiştir ( $p>0.05$ ). En yüksek aktivite geri kazanımının sağlandığı uygulama %80 tuz doygunluğundaki çöktürme işlemlerinde (1 saat hariç) elde edilmiştir. %90 tuz doygunluğunda 1 saatlik çöktürme denemesinde %88.33 ( $\pm 1.60$ ) verim elde edilirken, yüksek tuz konsantrasyonunun enzimler üzerindeki olumsuz etkisinden dolayı, ilerleyen çöktürme sürelerinde hızlı bir aktivite kaybının meydana geldiği görülmüştür. %70 tuz doygunluğunda gerçekleştirilen çöktürme uygulamasında 1, 2, 3 ve 4 saatlik uygulamalarda aktivite geri kazanımı ~%54-60 oranında elde edilirken, 6 saatlik çöktürmede daha yüksek oranda verim (%85.84 $\pm$ 4.65) elde edilmiştir. %60 tuz doygunluğunda gerçekleştirilen çöktürme denemelerinde aktivitenin büyük oranda tüm sürelerde kaybedildiği görülmektedir (~%6-12 verim) (Çizelge 4.1). Düşük tuz

konsantrasyonlarının enzimlerin çöktürülmesinde yetersiz kalmasından dolayı bu sonuçların elde edildiği düşünülmektedir.



Şekil 4.14. Farklı tuz doygunluk derecelerinde çöktürme işlemlerinin enzim aktivitesine (U/ml) etkisi

Çöktürme işlemlerinin enzim proteinlerindeki geri kazanım ve saflaştırma etkinliğine etkisi incelendiğinde (Çizelge 4.1), en yüksek saflaştırma katsayısı değerine ( $1.23 \pm 0.01$ ) %80 tuz konsantrasyonunda 4 saatlik çöktürme işleminde ulaşıldığı belirlenmiştir. %80 tuz doygunluğunda 2, 3 ve 6 saatlik çöktürme işlemlerinde elde edilen saflaştırma katsayılarının birbirine yakın olduğu belirlendiğinden, yapılan tez çalışması kapsamında aktivitenin en iyi korunduğu ve saflaştırmanın en etkin yapıldığı parametre olarak %80 tuz doygunluğunda 2 saatlik çöktürme işlemi seçilmiştir. Seçilen saflaştırma koşulunda elde edilen örnekler enzimin karakterizasyonu aşamasında kullanılmıştır.



Çizelge 4.1. Farklı tuz doygunluk derecelerinde çöktürme sonrası verim (%), toplam protein ( $\mu\text{g/ml}$ ), spesifik aktivite (U/g protein) ve saflaştırma katsayısı değerleri

Tuz Doymunluk (%)	Çöktürme Süresi (saat)	Verim (%)	Toplam protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	Spesifik aktivite (U/g protein)	Saflaştırma katsayısı
GNB besiyeri	-	100.00( $\pm 0.00$ )	65.02( $\pm 0.23$ )	147.28( $\pm 1.00$ )	1.00( $\pm 0.00$ )
90	1	88.33( $\pm 1.60$ )	49.06( $\pm 1.06$ )	172.56( $\pm 6.83$ )	1.17( $\pm 0.05$ )
	2	77.00( $\pm 1.63$ )	49.24( $\pm 0.32$ )	149.79( $\pm 4.15$ )	1.02( $\pm 0.03$ )
	3	72.04( $\pm 1.86$ )	45.94( $\pm 1.06$ )	142.91( $\pm 0.42$ )	0.97( $\pm 0.00$ )
	4	74.98( $\pm 4.01$ )	49.15( $\pm 0.87$ )	146.01( $\pm 5.22$ )	0.99( $\pm 0.04$ )
	6	62.67( $\pm 2.34$ )	53.09( $\pm 0.23$ )	113.02( $\pm 3.74$ )	0.77( $\pm 0.03$ )
80	1	62.88( $\pm 0.14$ )	50.20( $\pm 1.01$ )	120.00( $\pm 2.68$ )	0.81( $\pm 0.02$ )
	2	93.21( $\pm 0.82$ )	51.30( $\pm 1.38$ )	165.67( $\pm 2.99$ )	1.18( $\pm 0.02$ )
	3	92.77( $\pm 2.46$ )	50.34( $\pm 0.14$ )	167.94( $\pm 4.00$ )	1.14( $\pm 0.03$ )
	4	93.66( $\pm 1.12$ )	49.70( $\pm 0.23$ )	171.76( $\pm 1.26$ )	1.23( $\pm 0.01$ )
	6	94.63( $\pm 3.13$ )	52.95( $\pm 0.37$ )	162.91( $\pm 6.52$ )	1.16( $\pm 0.05$ )
70	1	54.19( $\pm 0.60$ )	42.72( $\pm 0.87$ )	121.47( $\pm 1.13$ )	0.82( $\pm 0.01$ )
	2	55.15( $\pm 1.99$ )	45.98( $\pm 0.46$ )	114.90( $\pm 5.28$ )	0.78( $\pm 0.04$ )
	3	59.65( $\pm 3.23$ )	48.55( $\pm 0.46$ )	117.61( $\pm 5.26$ )	0.80( $\pm 0.04$ )
	4	60.40( $\pm 3.41$ )	46.72( $\pm 0.64$ )	123.92( $\pm 8.69$ )	0.84( $\pm 0.06$ )
	6	85.84( $\pm 4.65$ )	46.17( $\pm 0.83$ )	177.94( $\pm 6.46$ )	1.21( $\pm 0.04$ )
60	1	6.67( $\pm 0.21$ )	40.75( $\pm 0.64$ )	15.67( $\pm 0.25$ )	0.11( $\pm 0.00$ )
	2	10.50( $\pm 0.64$ )	43.09( $\pm 0.50$ )	23.33( $\pm 1.15$ )	0.16( $\pm 0.01$ )
	3	5.93( $\pm 0.25$ )	36.53( $\pm 0.28$ )	15.53( $\pm 0.53$ )	0.11( $\pm 0.00$ )
	4	5.96( $\pm 0.78$ )	31.12( $\pm 0.55$ )	18.39( $\pm 2.73$ )	0.12( $\pm 0.02$ )
	6	11.50( $\pm 0.92$ )	36.94( $\pm 0.78$ )	29.76( $\pm 1.76$ )	0.20( $\pm 0.01$ )

Amonyum sülfat presipitasyonu mTG enziminin kısmi saflaştırılmasında ve konsantre edilmesinde kullanılmaktadır. *S. ladakanum* türünden elde edilen mTG'nin %55-75 doygunlukta amonyum sülfat tuzu ile kısmi saflaştırılması yapılarak en iyi verim %65 doygunlukta elde edilmiştir (Tsai ve ark., 1996). El-Hofi ve ark. (2014) bitkisel bir kaynaktan (*Rosmarinus officinalis L.*) elde ettikleri TG enzim ekstraktını %20-30 doygunlukta amonyum sülfat tuzu ile muamele ettikleri çalışmalarında %32.34 verim elde ederken spesifik aktivitede 1.68 katlık bir artış sağlamışlardır. Noda ve ark. (2013) farklı *S. lividans* suşlarından elde ettikleri mTG enziminin saflaştırılması aşamasında besiyerinde amonyum sülfat ile çöktürme işlemini gerçekleştirmişler ve diyaliz edilen örneğe ileri saflaştırma işlemleri uygulamışlardır.

Mikrobiyal TG enziminin kısmi saflaştırılması için gerekli tuzla çöktürme şartları belirlendikten sonra, daha saf enzim proteininin elde edilmesi ve saflaştırma katsayısının artırılması amacı ile ortamdaki istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlamak üzere iki kademeli tuzla çöktürme işlemi uygulanmıştır. İki kademeli tuzla çöktürme denemelerinden elde edilen enzim aktivitesi (U/ml), toplam protein içeriği ( $\mu\text{g/ml}$ ), spesifik aktivite (U/g protein), verim (%) ve saflaştırma katsayısı sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Enzim çözeltilerinin %30 tuz ile ön çöktürme işlemine tabi tutulması ile aktivitede yaklaşık %6.50’lik bir kayıp görülmüştür. Ön çöktürme sonrası enzim çözeltileri %80 ve %90 doygunlukta tuz ile çöktürülmüş ve aktivitenin başlangıç enzim aktivitesine göre yaklaşık %83 oranında korunduğu belirlenmiştir. İki kademeli çöktürme işleminde aktivitenin korunma oranı tek kademeli çöktürme işlemi ile yakın olmasına rağmen saflaştırma katsayılarının (~1.08) daha düşük olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak enzim sıvısındaki proteinlerin iki kademeli olarak çöktürülmesi işlemi enzim aktivitesinin korunmasında başarılı olurken saflaştırma katsayısında herhangi bir artışa sebep olmamıştır.

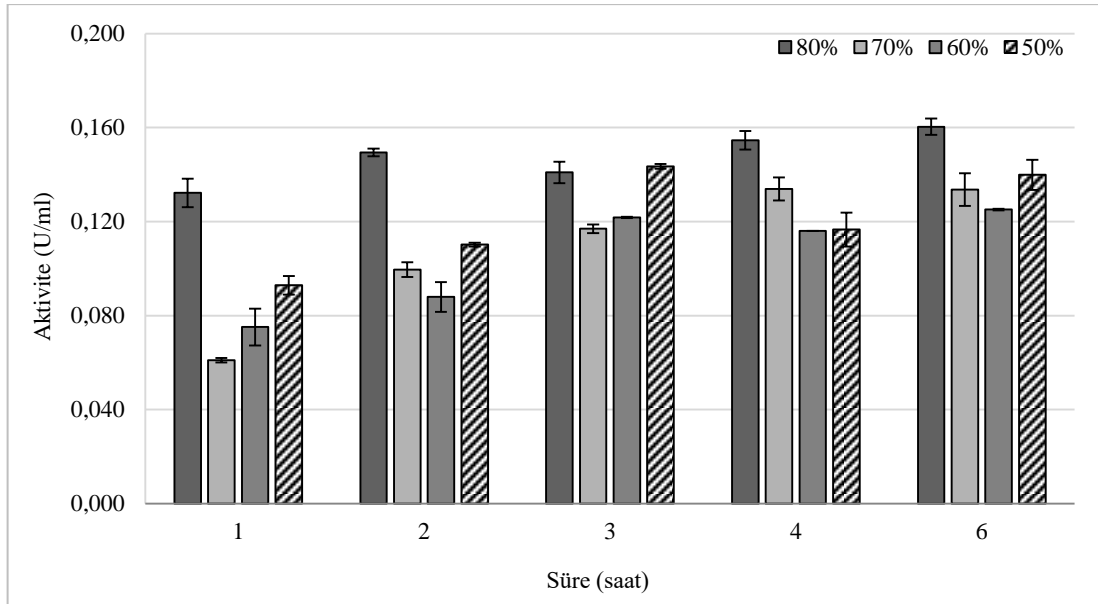
Çizelge 4.2. İki kademeli çöktürme sonrası verim (%), toplam protein ( $\mu\text{g/ml}$ ), spesifik aktivite (U/g protein) ve saflaştırma katsayısı değerleri

Tuz Konsantrasyonu (%)	Çöktürme Süresi (saat)	Aktivite (U/ml)	Verim (%)	Spesifik aktivite (U/g protein)	Toplam protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	Saflaştırma katsayısı
GNB besiyeri	-	0.0091( $\pm 0.0001$ )	100.00( $\pm 0.00$ )	140.18( $\pm 2.43$ )	65.02( $\pm 0.23$ )	1.00( $\pm 0.00$ )
30	1	0.0006( $\pm 0.0001$ )	6.19( $\pm 0.86$ )	11.54( $\pm 1.84$ )	49.06( $\pm 1.06$ )	0.08( $\pm 0.01$ )
90	1	0.0076( $\pm 0.0003$ )	83.30( $\pm 3.54$ )	151.41( $\pm 9.47$ )	50.20( $\pm 1.01$ )	1.08( $\pm 0.07$ )
30	1	0.0006( $\pm 0.0002$ )	6.90( $\pm 1.72$ )	12.89( $\pm 3.46$ )	49.06( $\pm 1.06$ )	0.09( $\pm 0.02$ )
80	2	0.0075( $\pm 0.0004$ )	82.36( $\pm 4.10$ )	149.74( $\pm 10.46$ )	50.20( $\pm 0.99$ )	1.07( $\pm 0.07$ )

#### 4.5.2. Alkol ile Çöktürme

GNB besiyerindeki proteinlerin ve enzimlerin farklı alkol konsantrasyonlarında (%50-80) çöktürülmeleri sonucu elde edilen aktivite (U/ml), verim (%), spesifik aktivite (U/g protein), saflaştırma katsayısı ve toplam protein ( $\mu\text{g/ml}$ ) miktarlarına ait sonuçlar Çizelge 4.3 ve Şekil 4.15’te verilmiştir. Fermantasyon sonrası biyokütleden arındırılmış besiyeri sıvısının artan konsantrasyonlarda alkol ile farklı sürelerde muamele edilmesi sonucu enzim aktivitesinin en iyi korunduğu alkol konsantrasyonu %80 olarak belirlenmiş olup bu konsantrasyonda 4 ve 6 saatlik çöktürme sürelerinde verim sırası ile

%95.16 ( $\pm 2.39$ ) ve %98.72 ( $\pm 2.13$ ) olarak belirlenmiştir ( $p > 0.05$ ). Alkol ile çöktürme aşamasında elde edilen en yüksek verim değerinin amonyum sülfat ile çöktürmede elde edilen en yüksek verim ( $\sim 94$ ) değeri ile benzer olduğu belirlenmiştir. Bu durum alkol ile çöktürme işleminin mTG enziminde benzer bir aktivite kaybına sebep olduğu sonucunu ortaya koymaktadır. Genel olarak düşük alkol konsantrasyonlarında (%50, 60 ve 70) ve kısa sürelerde (1 ve 2 saat) elde edilen verim değerlerinin daha düşük düzeylerde kaldığı görülmüştür. Örneklerden alkolle çöktürme sonrası elde edilen saflaştırma katsayıları incelendiğinde verim sonuçları ile paralel şekilde %80 alkol konsantrasyonunda 4 ve 6 saatlik çöktürme işlemlerinde sırası ile 0.95 ( $\pm 0.03$ ) ve 1.00 ( $\pm 0.02$ ) değerleri elde edilmiştir. Alkol ile çöktürmede ulaşılan en yüksek saflaştırma katsayı değerinin, %80 amonyum sülfat çöktürmede elde edilen en yüksek saflaştırma katsayısından ( $1.23 \pm 0.01$ ) daha düşük olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Alkol ile çöktürme işleminin özellikle besiyerinde bulunan tüm proteinlerin daha az bir seçicilikle çökmesine neden olarak mTG enziminin saflığını olumsuz yönde etkilemiştir. Benzer şekilde Cui ve ark. (2007) %70 etil alkol ile besiyerinden mTG enzimini saflaştırdıkları çalışmada %85 verime ulaşırlarken, saflaştırma katsayısını 2 olarak belirlemişlerdir.



Şekil 4.15. Farklı alkol konsantrasyonlarında çöktürme işlemlerinin enzim aktivitesine (U/ml) etkisi

Çizelge 4.3. Farklı alkol konsantrasyonlarında çöktürme sonrası verim (%), toplam protein ( $\mu\text{g/ml}$ ), spesifik aktivite (U/g protein) ve saflaştırma katsayısı değerleri

Alkol Konsantrasyonu (%)	Çöktürme Süresi (saat)	Verim (%)	Toplam protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	Spesifik aktivite (U/g protein)	Saflaştırma katsayısı
GNB besiyeri	-	100.00( $\pm 2.23$ )	77.71( $\pm 0.22$ )	2090.93( $\pm 52.72$ )	1.00( $\pm 0.03$ )
80	1	81.40( $\pm 3.72$ )	76.36( $\pm 0.34$ )	1732.26( $\pm 86.81$ )	0.83( $\pm 0.04$ )
	2	91.97( $\pm 1.01$ )	78.04( $\pm 0.11$ )	1914.70( $\pm 23.78$ )	0.92( $\pm 0.01$ )
	3	86.77( $\pm 2.82$ )	76.75( $\pm 0.17$ )	1836.78( $\pm 63.66$ )	0.88( $\pm 0.03$ )
	4	95.16( $\pm 2.39$ )	78.16( $\pm 0.34$ )	1978.46( $\pm 58.25$ )	0.95( $\pm 0.03$ )
	6	98.72( $\pm 2.13$ )	76.42( $\pm 0.06$ )	2098.98( $\pm 43.66$ )	1.00( $\pm 0.02$ )
70	1	37.55( $\pm 0.58$ )	77.20( $\pm 0.06$ )	790.16( $\pm 12.88$ )	0.38( $\pm 0.01$ )
	2	61.31( $\pm 1.91$ )	81.58( $\pm 0.51$ )	1220.67( $\pm 30.54$ )	0.58( $\pm 0.01$ )
	3	71.99( $\pm 1.12$ )	77.03( $\pm 0.11$ )	1518.27( $\pm 21.33$ )	0.73( $\pm 0.01$ )
	4	82.41( $\pm 3.03$ )	79.28( $\pm 0.11$ )	1688.67( $\pm 59.69$ )	0.81( $\pm 0.03$ )
	6	82.25( $\pm 4.25$ )	82.76( $\pm 0.22$ )	1614.34( $\pm 79.09$ )	0.77( $\pm 0.04$ )
60	1	46.26( $\pm 4.84$ )	80.63( $\pm 0.11$ )	932.36( $\pm 98.76$ )	0.45( $\pm 0.05$ )
	2	54.13( $\pm 3.88$ )	78.16( $\pm 0.11$ )	1125.35( $\pm 82.28$ )	0.54( $\pm 0.04$ )
	3	74.97( $\pm 0.16$ )	80.52( $\pm 0.11$ )	1512.69( $\pm 5.33$ )	0.72( $\pm 0.00$ )
	4	71.40( $\pm 0.00$ )	80.69( $\pm 0.17$ )	1437.82( $\pm 3.00$ )	0.69( $\pm 0.00$ )
	6	77.04( $\pm 0.21$ )	80.46( $\pm 0.17$ )	1555.59( $\pm 1.03$ )	0.74( $\pm 0.00$ )
50	1	57.16( $\pm 2.45$ )	66.02( $\pm 0.34$ )	1406.33( $\pm 52.99$ )	0.67( $\pm 0.03$ )
	2	67.84( $\pm 0.48$ )	73.78( $\pm 0.11$ )	1494.08( $\pm 12.81$ )	0.71( $\pm 0.01$ )
	3	88.31( $\pm 0.64$ )	76.58( $\pm 0.34$ )	1873.36( $\pm 5.29$ )	0.90( $\pm 0.00$ )
	4	71.78( $\pm 4.41$ )	78.27( $\pm 0.22$ )	1489.66( $\pm 87.30$ )	0.71( $\pm 0.04$ )
	6	86.07( $\pm 3.93$ )	80.40( $\pm 0.11$ )	1739.16( $\pm 77.05$ )	0.83( $\pm 0.04$ )

#### 4.5.3. Diyaliz işlemi

Amonyum sülfat ile çöktürme denemelerinde elde edilen koşullarda (%80 tuz doygunluk, 2 saat) gerçekleştirilen kısmi saflaştırılmış çöktürmelerdeki tuzların ve küçük moleküllerin uzaklaştırılarak daha saf bir enzim elde edilmesini sağlamak amacı ile diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz işlemleri için iki farklı teknik (ultra-filtrasyon ve klasik diyaliz torbası) denenmiş ve en uygun diyaliz yöntemi ve şartları belirlenmiştir. Diyaliz yöntemi, iyonik olan ve olmayan tüm küçük molekülleri uzaklaştırmak için basit, ucuz ve etkin bir yöntemdir. Genellikle çöktürmelerdeki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdan uzaklaştırmakta kullanılır. Ayrıca biyolojik moleküllere zayıf bir şekilde bağlı olan küçük iyonları ve molekülleri de bu yöntemle ortamdan uzaklaştırmak mümkündür (Özler, 2009).

Tuzla çöktürülmüş örneklerde diyaliz işlemi ilk olarak ultra-filtrasyon tüpleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enzim çözeltisi olarak GNB besiyerinde *S. mobaraensis* fermantasyonu ile elde edilen sıvı, santrifüj işlemlerinden geçirildikten sonra toplanan 10 ml'lik üst faz (0.0088 U/ml ve 131.006 U/g protein) tuzla çöktürmede ham enzim sıvısı olarak kullanılmıştır. Çizelge 4.4 incelendiğinde ultra-filtrasyon tüpleri ile gerçekleştirilen diyaliz basamağında başlangıç enzim çözeltisinin aktivitesi tuzla çöktürme basamağından sonra %96.24 oranında korunurken ultra-filtrasyon tüplerinde gerçekleştirilen diyaliz işlemi sonrasında ise bu oran %72.95'e düşmüştür ( $p<0.05$ ). Benzer şekilde spesifik aktivite değeri tuzla çöktürme sonrasına (171.71 U/g protein) göre daha düşük değerde (147.94 U/g protein) bulunduğu için saflaştırma katsayısı 1.14 olarak gerçekleşmiştir. Klasik diyaliz torbası ile gerçekleştirilen işlemde ise %80 verim ve 1.25 saflaştırma katsayısı elde edilmiştir. Ando ve ark. (1989) sıvı besiyerinden mTG enziminin konsantrite edilmesinde kullandıkları ultra-filtrasyon tekniği ile %92 verim elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.4. Ultra-filtrasyon ve diyaliz torbası ile diyaliz işlemlerinden elde edilen veriler

Uygulama	Aktivite (U/ml)	Toplam protein miktarı (µg/ml)	Spesifik Aktivite (U/g protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Enzim çözeltisi (GNB)	0.0088 (±0.00)	67.00 (±0.00)	131.01 (±0.00)	100.00	1.00 (±0.00)
*Tuz çöktürme	0.0085 (±0.00)	49.24 (±0.32)	171.71 (±1.12)	96.24	1.31 (±0.01)
*Ultra-filtrasyon	0.0064 (±0.00)	43.39 (±1.03)	147.94 (±3.51)	72.95	1.14 (±0.01)
*Diyaliz torbası	0.0070 (±0.00)	42.75 (±0.97)	163.76 (±2.65)	80.00	1.25 (±0.01)

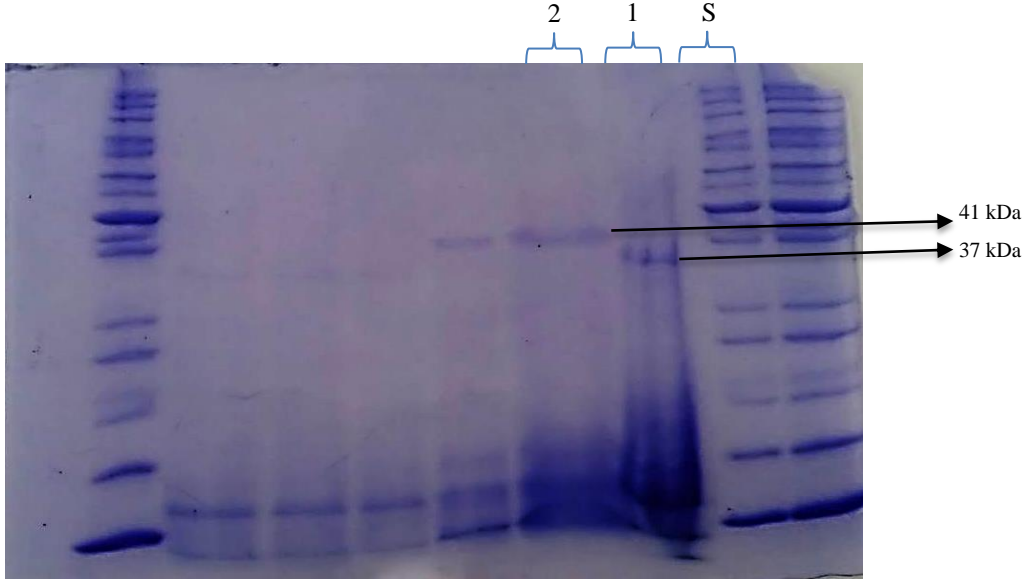
\*Tuz çöktürme, ultra-filtrasyon ve diyaliz sonrası ilk hacmine tampon ile tamamlanmış örneklere ait verilerdir.

## 4.6. Kısmi Saflaştırılmış mTG Enziminin Karakterizasyonu

### 4.6.1. Enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi

Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz işlemleri ile kısmi olarak besiyerinden saflaştırılan mTG enziminin elektroforetik olarak moleküler ağırlığının belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen SDS-PAGE analizinden elde edilen görüntü Şekil 4.16'da verilmiştir. Kısmi saflaştırılmış mTG enzime ait jel üzerindeki hat (1) incelendiğinde ~37 kDa moleküler ağırlığa sahip bir bant belirlenmiştir. Ayrıca bu hat üzerinde daha düşük moleküler ağırlığa sahip, 10-30 kDa aralığında iç içe geçmiş protein bantları

gözlemlenmektedir. Bu durum kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisi içerisinde mTG enzimi dışındaki birçok küçük protein fraksiyonunu işaret etmektedir. Diğer taraftan referans olarak jele yüklenen ticari mTG enzimine ait hat (2) incelendiğine ~41 kDa moleküler ağırlığına sahip bir bant izlenmiştir. Ticari enzimden elde edilen bandın moleküler ağırlığının besiyerinden saflaştırılan mTG enziminin moleküler ağırlığından biraz daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca jeldeki ticari enzim örneğine ait hattın daha temiz bir bant verdiği belirlenmiştir. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim çözeltisinin dondurarak kurutma yöntemi ile konsantre edilerek jele yüklenmesine rağmen, çözeltideki enzim konsantrasyonunun çok düşük olması sebebi ile jel üzerinde daha keskin ve belirgin protein bantları elde edilememiştir. Örneğe ait jel görüntüsü incelendiğinde mTG enziminin zimojeni olan pro-TG formuna ait herhangi bir belirgin bant gözlemlenmemiştir. Yapılan bazı çalışmalarda mTG üretimlerinde besiyeri ortamında farklı moleküler ağırlığa sahip pro-TG formları belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2009). Zhang ve ark. (2012a) *S. mobaraensis* kültürü ile MgCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde ürettikleri mTG enzimini elektroforezde incelediklerinde enzimin moleküler ağırlığını 39 kDa olarak belirlemişler ve daha yüksek moleküler ağırlıklı olan (45 kDa) pro-TG formunu da gözlemlemişlerdir. Nagy ve Szakacs (2008) farklı *Streptomyces* türlerinden (*S. mobaraensis* NRRL B-3729, *S. platensis* NRRL 2364, *S. paucisporogenes* ATCC 12596) katı hal fermantasyonu ile ürettikleri mTG enziminin moleküler ağırlığını ~37 kDa, pro-TG formunu ise 42 kDa olarak belirlemişlerdir. Langston ve ark. (2007) *S. mobaraensis* ve *S. platensis* türleri tarafından üretilen mTG enzimlerinin moleküler ağırlıklarının ise sırası ile 37 kDa ve 38 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Ando ve ark. (1989) *Streptoverticillium* S-S112 suşundan ürettikleri mTG enziminin moleküler ağırlığını 40 kDa olarak belirlemişler ve enzimin monomerik bir yapıda olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.16. Kısmi saflaştırılmış mTG enzimine ait SDS-PAGE elektroforez görüntüsü. Kısmi saflaştırılmış mTG enzimi (hat 1), ticari mTG enzimi (hat 2), moleküler ağırlık standardı (hat S)

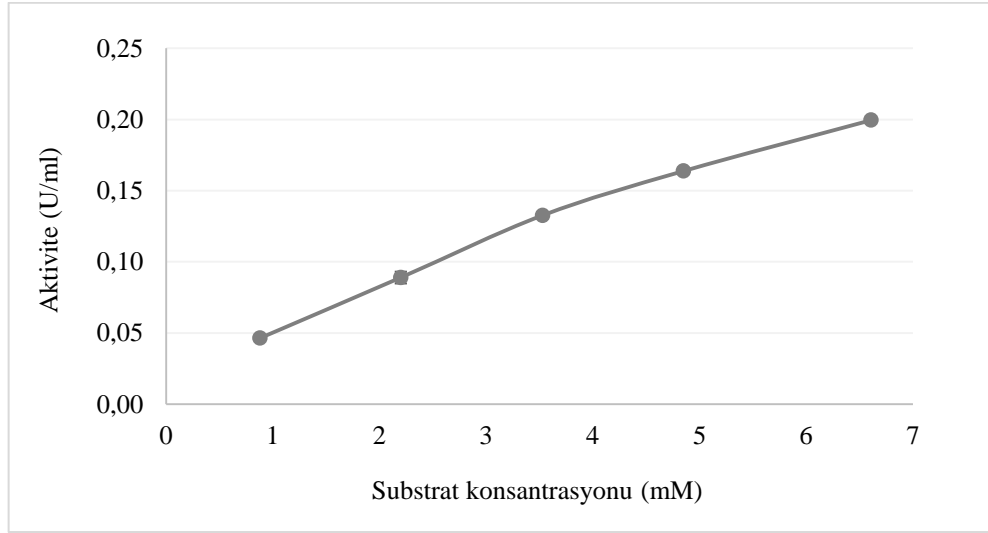
#### 4.6.2. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Michaelis-Menten denklemi bir hiperbol şeklindedir ve maksimum hız ( $V_{max}$ ) ve Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) olmak üzere iki parametreye sahiptir.  $V_{max}$  genellikle enzimin substratla tamamen doyması halinde gözlemlenen hızı tarif etmek üzere yorumlanır.  $V_{max}$  değeri hem enzim konsantrasyonu hem de katalitik hız sabitinin bir fonksiyonudur.  $K_m$  enzim-substrat etkileşiminin afinitesinin bir ölçüsüdür. Daha küçük bir  $K_m$  değeri, enzim ve substrat arasında daha yüksek bir affinite olduğunu gösterir ve bu, reaksiyon hızının  $V_{max}$ 'a daha hızlı ulaştığı anlamına gelir. Bu nedenle her bir parametre, ilgili enzimin özelliklerine bağlı olarak iyi tanımlanmış bir fiziksel anlama sahiptir. Bir enzim ile çalışırken,  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini ölçmek oldukça faydalıdır. Prensip olarak,  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri iki farklı substrat konsantrasyonunda (S) hız (V) ölçülerek belirlenir ve iki bilinmeyen çözüme olanak veren iki farklı denklem üretilir. Birçok enzim basit Michaelis-Menten kinetiği göstermediğinden, hangi matematiksel modelin daha doğru olduğunu belirlemek için daha fazla veri analizi gerekmektedir. Enzim kinetiğinin belirlenmesinde bu yüzden bir dizi substrat konsantrasyonu için reaksiyon hızı ölçülür ve daha sonra  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini belirlemek için tüm veriler kullanılır. Veriyi iki boyutlu bir denkleme uydurmak için kabul edilen yöntem, teorik değerlerden bağımlı değişkenin sapmalarını en aza indiren parametreleri hesaplamaktır. En küçük kareler lineer regresyon analizi, herhangi bir veri

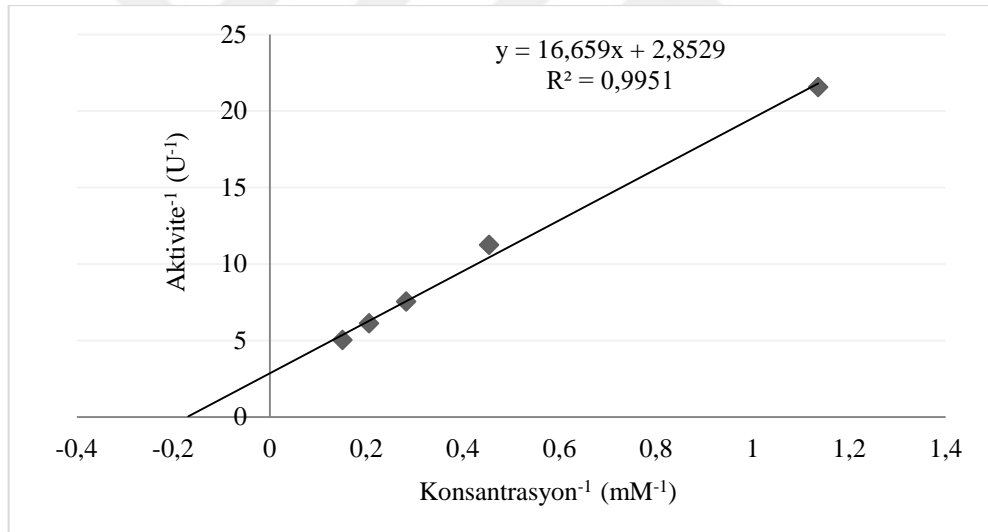
kümesi için eğimin ve y-eksen kesişiminin tam olarak hesaplanmasını sağlamaktadır. Ancak, birçok matematiksel modelde olduğu gibi Michaelis-Menten denklemi doğrusal bir denklem değildir ve çoğu doğrusal olmayan denklemde olduğu gibi parametreler herhangi bir veri kümesi için tam olarak hesaplanamamaktadır. Enzimatik reaksiyon verilerini analiz etmek için çeşitli lineerizasyon yaklaşımları geliştirilmiştir. 1934'te Hans Lineweaver ve Dean Burk tarafından Michaelis-Menten denklemi yeniden düzenlenmiştir. Bu denklemde  $1/V$ 'ye karşı  $1/(S)$  ile çizilen grafik doğrusaldır. Elde edilen doğrunun eğimi ( $K_m/V_{max}$ ) ve y-ekseni kesişim noktası ( $1/V_{max}$  olan) kinetik parametrelerin hesabına olanak tanımaktadır (Schulz, 1994; Schnell ve Maini, 2003).

Tez çalışmasında, artan substrat (Z-Gln-Gly) konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi pH 6.0'da 37°C'de belirlenmiştir (Şekil 4.17). Michaelis-Menten grafiği incelendiğinde, enzimin artan substrat konsantrasyonuna karşı aktivitesinde lineer bir artış olduğu görülmekte ve bu durum reaksiyonun 1. dereceden kinetik gösterdiğini açıklamaktadır. Michaelis-Menten parametrelerinin belirlenmesinde lineer regresyon metodu (Lineweaver-Burk) kullanılmış ve Michaelis sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{max}$ ) değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.18). Deneysel verilerden elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinde yüksek korelasyon katsayısı (%99.51) elde edilmiştir. Belirli bir enzim konsantrasyonunda maksimum hızı temsil eden  $V_{max}$  değeri kısmi saflaştırılmış mTG enziminde 0.350 U/ml olarak bulunmuştur. Saflaştırma işlemleri sırasında özellikle aktif merkezi de meydana gelen hasarlar enzimlerde reaksiyon hızının ve  $V_{max}$  değerinin azalmasına sebep olabilmektedir (Estevinho ve ark., 2013). Tez çalışmasında kısmi olarak saflaştırılan enzimin  $K_m$  değeri ise 6.350 mM olarak hesap edilmiştir. Cui ve ark. (2007) *S. hygrosopicus* suşu ile ürettikleri enzimi kromatografik olarak saflaştırdıkları çalışmada enziminin  $V_{max}$  değerini 1.28 U/ml,  $K_m$  değerini ise 54.69 mM olarak belirlemişlerdir.





Şekil 4.17. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim aktivitesi üzerine substrat (S) konsantrasyonunun etkisi (Michaelis-Menten grafiği)

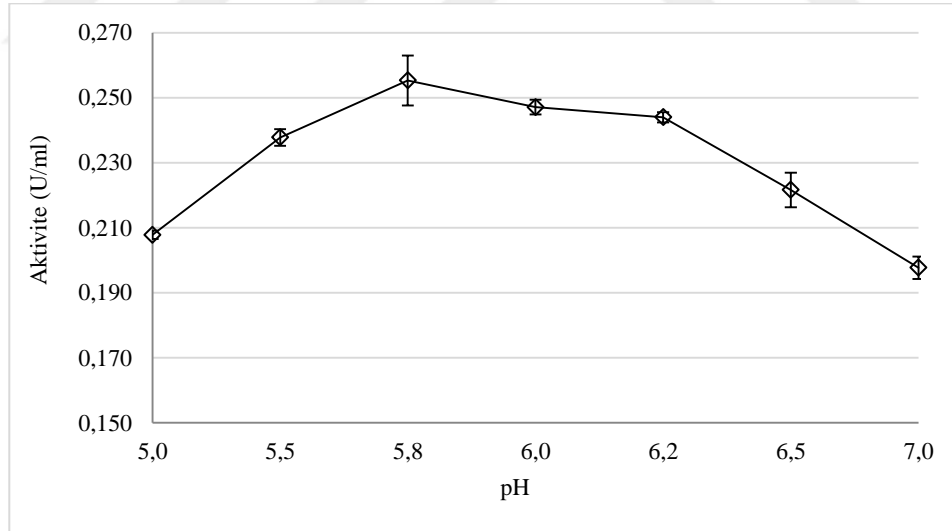


Şekil 4.18. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim aktivitesi üzerine substrat (S) konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk grafiği) (X eksen kesim noktası  $-1/K_m$ , Y eksen kesim noktası  $1/V_{max}$ )

#### 4.6.3. Enzim aktivitesi ve stabilitesine pH ve sıcaklığın etkisi

Mikrobiyal TG enziminin optimum çalışma pH aralığı 5.0-7.0 ve izoelektrik noktası pH 8.9-9.0 olarak bilinmektedir (Ando ve ark., 1989; Ho ve ark., 2000; Cui ve ark., 2007). Enzimatik aktivite için optimum sıcaklık 45-55°C'dir ve 70°C'de birkaç dakikada aktivitesinde önemli kayıplar meydana gelmektedir (Motoki ve Seguro, 1998).

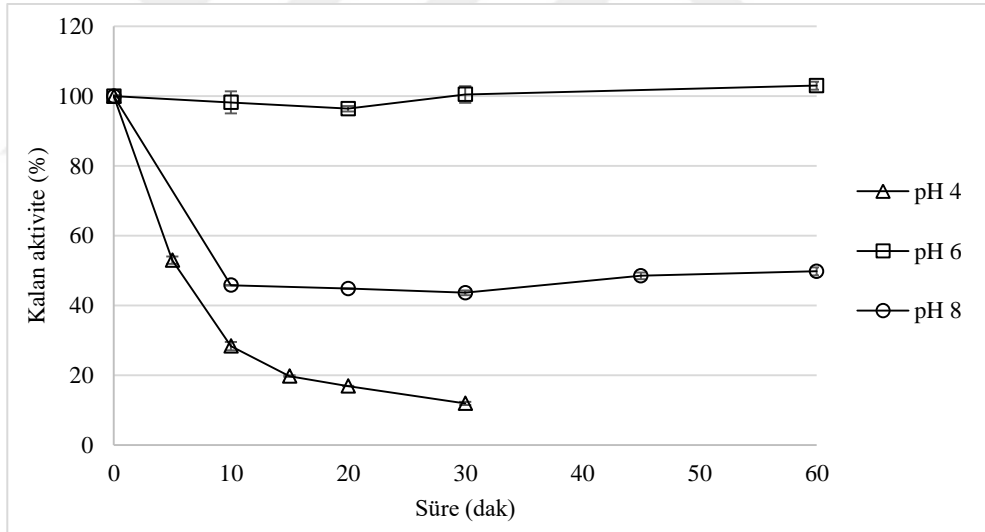
Mikrobiyal TG enzim aktivitesine pH'nın etkisini belirlemek için reaksiyon karışımı farklı pH değerlerine (pH 5.0-7.0) ayarlanarak 37°C'de enzim aktiviteleri belirlenmiştir. En yüksek aktivite değerine (0.255±0.008 U/ml) pH 5.8'de ulaşılırken ( $p<0.05$ ), pH 6.0 ve pH 6.2'de benzer ( $p>0.05$ ) aktivite değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.19). Optimum noktadan sonra pH değerindeki artışa bağlı olarak enzim aktivitesi azalarak pH 7.0'de 0.198 (±0.003) U/ml, pH 5.0'te ise 0.208 (±0.001) U/ml değerine düşmüştür ( $p<0.05$ ). Alkali pH değerlerinde enzim aktivitesindeki azalma daha hızlı gerçekleşirken, asidik pH değerlerinde daha yavaş gerçekleştiği görülmektedir. Cui ve ark. (2007) mTG enzim aktivitesine pH'nın etkisini inceledikleri çalışmada optimum çalışma pH'sını 6.0-7.0 olarak belirlemişler ve asidik pH değerlerinde aktivitede daha hızlı bir kayıp yaşandığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilen TG enzimi için belirlenen optimum çalışma pH değerlerinin farklı olduğu görülmüş ve *B. subtilis* için pH 8.2 olarak belirlenmiştir (Suzuki ve ark., 2000). Hayvansal ve bitkisel kaynaklı TG enzimleri için optimum pH değerleri sırası ile 8.0 ve 7.6 olarak bildirilmiştir (Zhu ve ark., 1996).



Şekil 4.19. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim aktivitesine pH'nın etkisi

Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için pH 4.0, 6.0 ve 8.0'de farklı sürelerde bekletilen enzim çözeltilerinin standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak aktiviteleri belirlenmiş ve kalan aktivite (%) değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.20) (EK-F.2). Kısmi saflaştırılmış mTG enziminin pH 6.0'da 60 dakika inkübasyonu

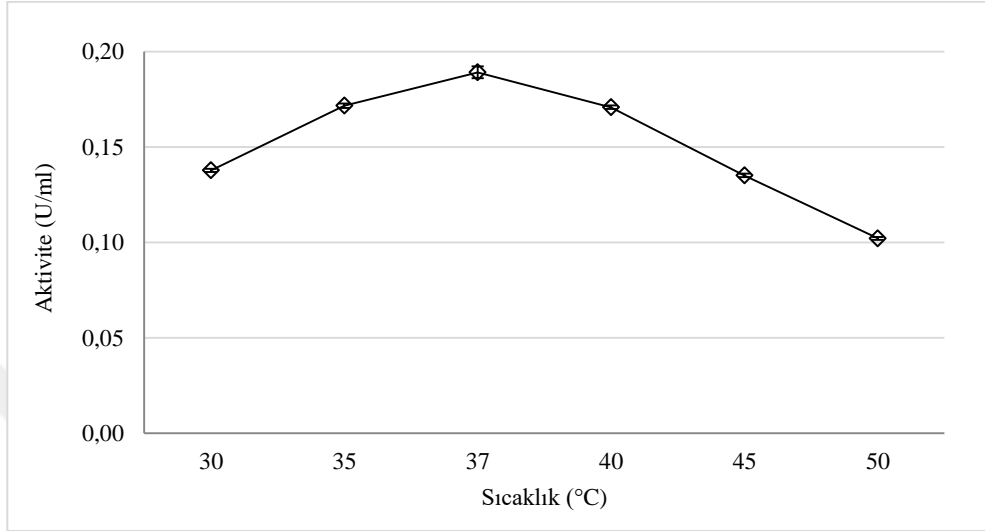
sonucu stabilitesinde önemli bir kaybın meydana gelmediği görülmüştür ( $p>0.05$ ). pH 8.0 ve pH 4.0'te ise 60 ve 30 dakika inkübasyon sonucunda kalan aktivite değerleri sırası ile %49.78 ve %11.93 olarak belirlenmiştir. Asidik pH değerinde (pH 4.0) aktivitede meydana gelen kayıplar daha fazla ve hızlı gerçekleşirken alkali pH değerinde (pH 8.0) daha az ve yavaş gerçekleşmiştir ( $p<0.05$ ). Ho ve ark. (2000) *S. ladakanum* suşundan saflaştırdıkları mTG enziminin pH stabilitesini incelemişler ve pH 3.0'te %22, pH 8.0'de %68 kalan aktivite değerleri elde etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise kromatografik olarak saflaştırılmış mTG enziminin pH 4.0'te aktivitesini tamamen kaybettiğini, pH 8.0 ve pH 9.0'da ise sırası ile %78 ve %40 koruduğunu bildirmişlerdir (Cui ve ark., 2007). Yapılan bu çalışmalarda asidik pH değerlerinde enzim stabilitesinin daha çok etkilendiği ve aktivite kayıplarının tez çalışmasında elde edilen sonuçlara benzer şekilde bu pH değerlerinde daha fazla olduğu bildirilmektedir.



Şekil 4.20. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim stabilitesine pH'nın etkisi

Kısmi saflaştırılmış mTG enziminin 30-50°C aralığındaki sıcaklıklarda belirlenen enzim aktivitesi değerleri incelendiğinde (Şekil 4.21) en yüksek aktivite değerinin 37°C'de 0.189 ( $\pm 0.003$ ) U/ml olarak diğerlerinden daha yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ). Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değerindeki artış ile birlikte aktivitenin azalarak 50°C'de 0.102 U/ml değerine düştüğü belirlenmiştir. Cui ve ark. (2007) mTG enziminin en iyi çalıştığı sıcaklık derecesini 37-45°C olarak

belirlemiştir. Ancak bazı araştırmacılar özellikle *S. mobaraensis* suşlarından elde edilen enzimler için optimum sıcaklığın 55-60°C olduğunu bildirmişlerdir (Ando ve ark., 1989; Ho ve ark., 2000).

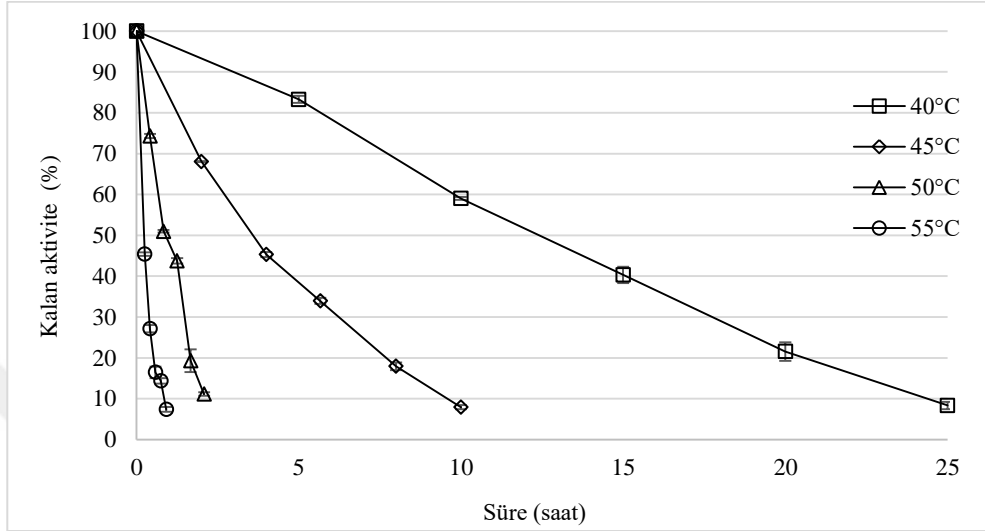


Şekil 4.21. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

Mikrobiyal TG enziminin farklı sıcaklıklarda termal stabilitesi incelendiğinde (Şekil 4.22) (EK-F.1) 40°C’de 1500 dakika ve 45°C’de 600 dakikada kalan aktivite değerleri sırası ile %8.37 ve %7.93 olarak hesaplanmıştır. Enzim 40°C’de 300 dakikada aktivitesini büyük oranda (%83.25) korumayı başarmıştır. Diğer taraftan mTG enzimi 50°C’de 125 dakika ve 55°C’de 55 dakikada aktivitesini çok hızlı bir şekilde kaybederek sırası ile %11.13 ve %7.38 kalan aktivite değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.22). Isıl şiddet artışının enzim proteininde meydana getirdiği konformasyonel değişimler sonucunda aktivitede kayıplar gözlenmiştir.

Mikrobiyal TG enziminin ısıl stabilitesi özellikle enzimin gıda proseslerinde dayanımını ve etkinliğini belirleyen temel parametreler arasında yer almaktadır. Ho ve ark. (2000) saflaştırdıkları mTG enziminin farklı sıcaklıklardaki aktivitesi üzerine yaptıkları çalışmada 60°C’de kalan aktivitenin yaklaşık %45 olduğunu belirlemiştir. Nagy ve Szakacs (2008) farklı *Streptomyces* spp. kullanarak ultra-filtrasyon tekniği ile elde ettikleri mTG’nin farklı sıcaklıklardaki (25-70°C) aktivite kayıplarını incelemişler ve 70°C’de kalan aktivite değerlerini %0-10 olarak saptamışlardır. Lu ve ark. (2003) *S. mobaraensis* enziminin 40°C’de 10 dakika stabil kaldığını, ancak 60°C’de 10 dakika

uygulama sonrasında kalan aktivitenin %6 olduğunu belirlemişlerdir. Cui ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada 30 dakikada 40°C ve 60°C’de kalan aktivitenin sırası ile %80 ve %7 olduğunu bildirmişlerdir.



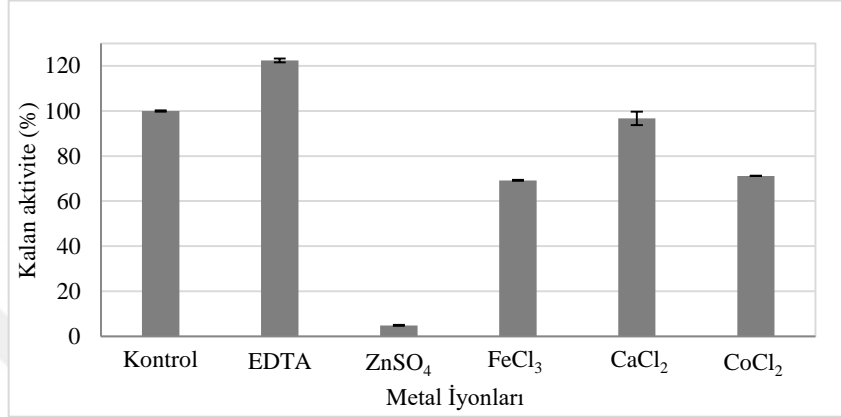
Şekil 4.22. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim stabilitesine sıcaklığın etkisi

#### 4.6.4. Enzim aktivitesine metal iyonlarının ve EDTA'nın etkisi

Mikrobiyal TG enzimi 3 boyutlu yapıları incelendiğinde aktif merkezinde asparajin, sistein ve histidin gibi aminoasitlerinden oluştuğu için çinko ( $Zn^{+2}$ ), kurşun ( $Pb^{+2}$ ), lityum ( $Li^{+2}$ ), bakır ( $Cu^{+2}$ ) gibi ağır metallerin aktif merkezde yer alan tiyol gruplarına bağlanarak enzimi inhibe ettikleri bilinmektedir (Ho ve ark., 2000; Macedo ve ark., 2010). Diğer taraftan kobalt ( $Co^{+2}$ ), baryum ( $Ba^{+2}$ ), potasyum ( $K^{+}$ ) gibi iyonlar tarafından ise aktivite artırılabilir (Kieliszek ve Misiewicz, 2014).

Enzim aktivitesinin ölçüldüğü reaksiyon ortamına ilave edilen 1 mM konsantrasyonundaki metal iyonlarının ve EDTA'nın kontrol örneğine göre enzim aktivitesinde meydana getirdiği etkiler Şekil 4.23'te ve EK-F.3'de verilmiştir. Kısmi saflaştırılmış mTG enziminin EDTA bulunan ortamda aktivitesinde anlamlı artış (%122.35) olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Ekren (2013) yaptıkları çalışmada EDTA'nın fitaz enzim aktivitesinde az da olsa artışa (%15-22) neden olmasını, reaksiyon ortamında enzim aktivitesini azaltan muhtemel metalleri bağlaması ile açıklamışlardır. Özellikle hayvansal ve bitkisel kaynaklı bazı TG enzimlerinin  $Ca^{+2}$  bağımlı olması ve

kofaktöre ihtiyaç göstermesinden dolayı bu gibi enzimlerin EDTA gibi şelatlaştırıcı ajanlar karşısında aktivitelerinin azalmasına neden olduğu bilinmektedir (Ho ve ark., 2000). Benzer şekilde El-Hofi ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, saflaştırılmış bitkisel TG enziminin EDTA gibi şelatlaştırıcı ajanlar tarafından aktivitesinin inhibe edildiğini bildirmişlerdir.



Şekil 4.23. Metal iyonlarının ve EDTA'nın mTG enzim aktivitesine etkisi

Metal iyonları ile gerçekleştirilen analizlerde özellikle Zn<sup>+2</sup> iyonu enzim aktivitesinin tamamına yakınının (%4.82) kaybolmasına sebep olmuştur. Co<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+2</sup> metal iyonlarında ise sırası ile %71.17 ve %69.17 kalan aktivite değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.23). Bu durum metaller tarafından enzimin aktif merkezinde bulunan sistein kalıntılarının oksidasyonu ile açıklanmaktadır (Kieliszek ve Misiewicz, 2014; Motoki ve Seguro, 1998). Cui ve ark. (2007) Co<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+2</sup> iyonları ile yaptıkları bir çalışmada mTG enziminin kalan aktivite değerlerini %90.8- %10.3 olarak bulurken, Ho ve ark. (2000) ise %44.6 - %91.7 olarak bulmuşlardır.

Kalsiyum bağımlı hayvansal kaynaklı TG enziminden farklı olarak saflaştırılan mTG enziminin Ca<sup>2+</sup> iyonları tarafından inhibe edilmediği ve kalan aktive değerinin %96.74 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23). Benzer şekilde yapılan diğer bazı çalışmalarda da mTG enziminin Ca<sup>2+</sup> iyonlarından çok fazla etkilenmediği bildirilmektedir (Ando ve ark., 1989; Ho ve ark., 2000; Cui ve ark., 2007). Bu durum özellikle Ca<sup>2+</sup> iyonlarına karşı duyarlı ve kolaylıkla çökelme eğiliminde olan kazein, soya ve miyosin gibi proteinlerin modifiye edilmelerinde oldukça kullanışlı olmaktadır (Motoki ve Seguro, 1998; Yokoyama ve ark., 2004).

## 5. SONUÇ

Tez çalışması kapsamında, transglutaminaz enziminin mikrobiyal olarak üretimi gerçekleştirilmiş ve üretimin artırılmasına yönelik çalışmalar yapılarak enzim aktivitesi artırılmıştır. Ayrıca elde edilen enzim farklı yöntemler ile kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır.

Mikrobiyal transglutaminaz (mTG) enziminin üretilmesi amacıyla literatürde üretici tür olarak belirtilen farklı bakteri türleri (*Streptomyces mobaraensis*, *Streptomyces ladakanum*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces sioyaensis*, *Streptomyces platensis* ve *Streptomyces hygroscopicus*) temin edilmiş ve ilk olarak çalışmalarda kullanılmak üzere aktifleştirme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ancak bu türlerden *S. hygroscopicus*, *S. sioyaensis* ve *S. platensis* ya hiç gelişim göstermemiş ya da yeterli düzeyde enzim üretecek kadar gelişme sağlamamıştır. Bu nedenle yüksek oranda mikrobiyal gelişme sağlanan *Streptomyces mobaraensis*, *S. ladakanum* ve *S. lividans* kültürleri ile mTG enziminin üretilmesi ve enzim aktivitesinin artırılması çalışmalarına devam edilmiştir.

Enzim üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla, yeterli düzeyde mikrobiyal gelişme gösteren enzim üreticisi üç farklı suş kullanılarak, enzim üretimine ortam pH'sı, inkübasyon sıcaklığı ve besiyeri bileşiminin etkisi araştırılmış ve en yüksek aktivitenin elde edileceği koşullar belirlenmiştir. Bu aşamada, *S. ladakanum* ve *S. lividans* suşlarının kullanıldığı herhangi bir koşulda ölçülebilir düzeyde yeterli enzim aktivitesi belirlenmemiştir. *S. mobaraensis* kullanılan koşullarda ise enzim aktivitesinin pH, sıcaklık ve besiyeri bileşimine göre farklılık gösterdiği ortaya konmuştur. Besiyeri başlangıç pH'sının yüksek olduğu koşullarda (pH 8.0) enzim aktivitesi belirlenemezken, en yüksek aktivite değerleri pH 6.0 koşulunda elde edilmiştir. İnkübasyon sıcaklığının düşük (20°C) veya yüksek (40°C) olduğu koşullarda enzim aktivitesinin düşük, 30°C koşulunda ise en yüksek olduğu belirlenmiştir. Besiyeri bileşiminin enzim aktivitesine olan etkisinin incelenmesi amacıyla nişasta-glukoz bazlı (GNB) ve soya unu bazlı (MIX) besiyerleri hazırlanmış ve inkübasyon süresi boyunca aktivite belirlenmiştir. Tüm koşullarda en yüksek enzim aktivitesi değerinin GNB besiyeri kullanıldığında elde edildiği görülmüştür. Tüm koşullar değerlendirildiğinde, en yüksek enzim aktivitesinin

(~0.04 U/ml) GNB sıvı besiyerinde, *S. mobaraensis* kültürü ile 30°C ve pH 6.0'da elde edildiği belirlenmiştir.

Enzim aktivitesinin artırılması amacıyla, belirlenen koşullarda (pH 6.0, 30°C, GNB besiyeri) statik inkübasyon yerine çalkalamalı (orbital) inkübasyon uygulanmış ve farklı çalkalama hızlarının (100, 150, 200 rpm) enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiştir. En yüksek aktiviteye ulaşılan 150 rpm çalkalama hızında enzim sentezinin 4. güne kadar hızlı bir şekilde arttığı ve 6. günde en yüksek seviyeye (~0.14 U/ml) ulaştığı fakat daha sonra aktivitenin hızlı bir şekilde düştüğü gözlenmiştir. Çalkalamalı inkübasyon ile statik inkübasyona göre aktivitede ~3.5 katlık bir artış sağlanmıştır. İnkübasyon süresince çalkalama işlemi sayesinde besiyeri bileşenleri ile mikroorganizmanın etkileşiminin daha kolay gerçekleşmesi ve ayrıca havalandırma sağlanması enzim üretimini artırmış ve buna bağlı olarak aktivitede artış belirlenmiştir.

Çalkalama işlemi ile enzim üretiminde artış sağlanmasından dolayı karıştırma ve havalandırmanın aktivite artışında önemli bir faktör olduğu ve bu sebepten kontrollü bir fermantasyon sistemi ile enzim üretiminde önemli bir artış sağlanması düşünülmüştür. Besiyeri pH'sı ve sıcaklığı ile hava akış hızı fermantasyon boyunca sabit tutularak farklı radyal karıştırma hızlarında (200-1000 rpm) 5 gün boyunca aktivite takip edilmiştir. Kontrollü fermantasyon koşullarında en yüksek enzim aktivitesi değerine (~0.42 U/ml) 500 rpm karıştırma hızında fermantasyonun 3. günde ulaşıldığı ve aktivitenin bu günden sonra azalmaya başladığı belirlenmiştir. Hava akış hızının aktivite üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla sabit karıştırma hızında (500 rpm) farklı hava akış hızları (2, 6 ve 10 cm<sup>3</sup>/dak) kullanılarak fermantasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlardan hava akış hızının enzim aktivitesi üzerine etkisinin olduğu belirlenmiş ve en yüksek aktivite (~0.42 U/ml) 10 cm<sup>3</sup>/dak hava akış hızında elde edilmiştir. Böylelikle kontrollü fermantasyon koşulları ve radyal karıştırma işlemi ile statik inkübasyona göre ~10.5 kat, çalkalamalı inkübasyona göre ise ~3 katlık bir aktivite artışı sağlanmıştır.

Kontrollü fermantasyon koşulları ile enzim üretiminde sağlanan artışa ek olarak, bazı mikrobiyal stres faktörlerinin etkisi araştırılmış ve enzim aktivitesinin daha fazla artırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla sıcaklık (50 ve 60°C), farklı konsantrasyonlarda kullanılan alkol (etanol ve metanol), tuz (NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ve kimyasal (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve EDTA) stresi ile proteolitik enzim (pepsin ve tripsin) stresleri çalkalamalı



inkübasyon koşullarında uygulanmıştır. Tuz ve proteolitik enzim stresi haricinde uygulanan stres faktörlerinin enzim aktivitesinde artış sağlamadığı gözlenmiştir. Stres faktörü olarak  $MgCl_2$  ve  $Na_2SO_4$  tuzları kullanıldığında kontrol örneğine göre enzim aktivitesinde ~2 katlık,  $KCl$  ve  $NaCl$  kullanıldığında ise ~1.2 katlık artış elde edilmiştir. İnkübasyon ortamına ilave edilen tripsin enzim aktivitesini artırıcı etki gösterirken (~1.3 kat), pepsin enzimi aktivitede düşüşe sebep olmuştur.

Farklı inkübasyon koşulları kullanılarak aktivitesi artırılan mTG enziminin kısmi saflaştırma şartlarının belirlenebilmesi için farklı tuz (amonyum sülfat) ve alkol konsantrasyonlarında çöktürme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Tuz ile çöktürme işleminde, yüksek doyumlukta (%90) amonyum sülfat kullanıldığında özellikle uzun çöktürme sürelerinde aktivite kaybında artış görülmüş, %80 doyumlukta ilerleyen çöktürme sürelerinde aktivite kayıplarının daha az ve birbirine yakın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca gerçekleştirilen çalışmada iki kademeli çöktürme işlemi de uygulanmış ancak elde edilen saflaştırma katsayılarının tek kademeli çöktürme işlemine göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre %80 doyumlukta amonyum sülfat ile 2 saatlik çöktürme işleminin verim (%93.21) ve saflaştırma katsayısı (1.18) bakımından en uygun koşul olduğu bulgulanmıştır. Alkol ile çöktürme işleminde farklı alkol konsantrasyonları (%50-80) kullanılmış ve enzim aktivitesinin en iyi korunduğu alkol konsantrasyonu %80 olarak belirlenmiştir. Alkol ile çöktürme işleminde elde edilen en yüksek verim değeri (%98.72), tuz ile çöktürme işleminden elde edilen sonuçlara yakın olsa da saflaştırma katsayısının (1.00) daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum, alkol ile çöktürme işleminin özellikle besiyerinde bulunan tüm proteinlerin daha az bir seçicilikle çökmesine neden olarak enzimin saflığını olumsuz yönde etkilemesi ile açıklanmıştır. Kısmi olarak saflaştırılan enzim çözeltisinde bulunan safsızların giderilmesi amacıyla iki farklı yöntem (ultra-filtrasyon ve klasik diyaliz torbası) kullanılmış ve en uygun yöntem belirlenmiştir. Elde edilen verim ve saflaştırma katsayısı değerlerine göre klasik diyaliz torbası yönteminin ultra-filtrasyon işlemine göre daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür.

Kısmi olarak saflaştırılan mTG enziminin karakterizasyonu amacıyla enzimin moleküler ağırlığı belirlenmiş, enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun

etkisi, aktivite ve ayrıca stabiliteye pH ve sıcaklık ile bazı metal iyonları ve EDTA'nın etkisi saptanmıştır.

SDS-PAGE analizi sonucunda mTG enziminin moleküler ağırlığının ~37 kDa olduğu ve bu değerin literatür ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ayrıca analiz sonucunda mTG enziminin zimojeni olan pro-transglutaminaz formuna ait herhangi bir bulgu elde edilmemiştir. Kısmi olarak saflaştırılan mTG enziminin Michaelis-Menten parametreleri olan Michaelis sabiti ( $K_m$ ) 6.35 mM, maksimum hız ( $V_{max}$ ) 0.35 U/ml olarak hesaplanmıştır. Enzim aktivitesine pH'nın etkisini belirlemek için reaksiyon karışımı farklı pH değerlerine (pH 5.0-7.0) ayarlanarak 37°C'de enzim aktiviteleri belirlenmiştir. En yüksek aktivite değerine pH 5.8'de ulaşılmış, alkali pH değerlerinde enzim aktivitesindeki azalmanın daha hızlı gerçekleştiği, asidik pH değerlerinde ise daha yavaş gerçekleştiği gözlenmiştir. Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için, pH 4.0, 6.0 ve 8.0'de farklı sürelerde bekletilen enzim çözeltilerinin standart deney koşullarında aktiviteleri belirlenmiştir. Kısmi saflaştırılmış mTG enziminin pH 6.0'da 60 dakika inkübasyonu sonucu stabilitesinde önemli bir kaybın meydana gelmediği görülmüştür. Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi 30-50°C aralığında belirlenmiş ve en yüksek aktivite değeri 37°C'de elde edilmiştir. Enzim stabilitesi incelendiğinde ise aktivitenin ısı şiddetinin artması ile birlikte daha hızlı kaybolduğu görülmüş ve en düşük kalan aktivite 55°C'de ~%7 olarak belirlenmiştir.

Isıl şiddetinin artışı enzim molekülünde meydana gelen konformasyonel değişimler sonucu aktivite kayıplarına sebep olmuştur. Enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonları ( $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ) ve EDTA'nın etkisi araştırılmış ve EDTA bulunan ortamda enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu durum reaksiyon ortamında enzim aktivitesini azaltan muhtemel metallerin bağlanması ile açıklanmıştır. Metal iyonları ile gerçekleştirilen analizlerde ise  $Zn^{+2}$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin büyük oranda kaybolduğu,  $Co^{+2}$  ve  $Fe^{+2}$  metal iyonları varlığında ise aktivitedeki kaybın ~%30 olduğu belirlenmiştir.  $Ca^{+2}$  iyonlarının ise aktivite üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Gerçekleştirilen tez çalışması, mTG üretilmesini, üretim koşullarının belirlenmesini ve enzimin farklı yöntemler ile kısmi saflaştırılarak karakterize edilmesini kapsamaktadır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, saflaştırma basamakları zor ve maliyeti yüksek olan

hayvansal kaynaklı TG enzimi için alternatif olacak ve daha ucuz formda ticari TG enziminin üretimine yönelik işlemlerde kullanılabilir. Daha sonra yapılacak çalışmalarla, üretimi ve saflaştırılması tez kapsamında gerçekleştirilen enzim, toz ticari formuna da işlenebilecek ve raf ömrü artırılmış mTG enzim toz preparatları maliyeti düşük bir ürün olarak gıda endüstrisinde kullanılabilir.



## 6. KAYNAKLAR

- Aalami, M. ve Leelavathi, K., 2008. Effect of microbial transglutaminase on spaghetti quality. *J. Food Sci.*, 73 (5).
- Aidaros, H.I., Du, G., ve Chen, J., 2011. Microbial fed-batch production of transglutaminase using ammonium sulphate and calcium chloride by *Streptomyces hygroscopicus*. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng.*, 1(2), 173-178.
- Ando, H., Adachi, M. ve Umeda, K., 1989. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agr. Biol. Chem.*, 53, 2613-2617.
- Anonim, 2017. <https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/>. Erişim Tarihi 02.05.2017.
- Babiker, E.F., Matsudomi, N. ve Kato, A., 1998. Masking of antigen structure of soybean protein by conjugation with polysaccharide and crosslinkage with microbial transglutaminase. *Nahrung*, 42:158–159.
- Bahrim, G., Iancu, C., Buțu, N. ve Negoită, T.G., 2010. Production of a novel microbial transglutaminase using *Streptomyces* sp. polar strains. *Rom. Biotech. Lett.*, 15:5197–5203.
- Bech, L., Nørrevang, I. A., Halkier, T., Rasmussen, G., Schäfer, T., ve Andersen, J. T., 2001. U.S. Patent No. 6,190,879. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Bhattacharyya, B., Pal, S., ve Sen, S., 1998. Antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* D1.5, cultural effect. *Rev. Microbiol.*, 29(3), 254-257.
- Bourneow, C., Benjakul, S., Sumpavapol, P. ve Kittikun, A., 2012. Isolation and Cultivation of transglutaminase producing bacteria from seafood processing factories. *Innov. Rom. Food Biotechnol.*, 10, 28-39
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2), 248-254.
- Campos, A., Carvajal-Vallejos, P.K., Villalobos, E., Franco, C.F., Almeida, A.M., Coelho, A.V., Torné, J.M. ve Santos, M., 2009. Characterisation of *Zea mays* L. plastidial transglutaminase: interactions with thylakoid membrane proteins. *Plant. Biol.*, 12(5):708–716.
- Celler, K., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M. ve van Wezel, G.P., 2012. Structured morphological modeling as a framework for rational strain design of *Streptomyces* species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102(3), 409-423.
- Chambi, H., ve Grosso, C., 2006. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Res. Int.*, 39(4), 458–466.
- Chen, C., Wang, J., Guo, H., Hou, W., Yang, N., Ren, B. ve Zhang, L., 2013. Three antimycobacterial metabolites identified from a marine-derived *Streptomyces* sp. MS100061. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(9), 3885-3892.
- Chung, S., Shrager, R. ve Folk, J., 1970. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. VII Chemical and stereochemical aspects of substrate binding and catalysis. *J. Biol. Chem.*, 245:6424-6435.
- Clarke, D., Mycek, M., Neidle, A., ve Waelsch, H., 1959. The incorporation of amines into protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 79, 338–354.

- Cui, L., Du, G., Zhang, D., Liu, H. ve Chen, J., 2007. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. Food Chem., 105 (2), 612-618.
- Cui, L., Zhang, D., Huang, L., Liu, H., Du, G. ve Chen, J., 2006. Stabilization of a new microbial transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-13 by spray drying. Process Biochem., 41(6), 1427-1431.
- Donnelly, W.J., 1987. Ethanol stability of casein solutions as related to storage stability of dairy based alcoholic beverages. J. Food Sci., 52(2), 389-393.
- Doull, J.L., Singh, A.K., Hoare, M. ve Ayer, S.W., 1994. Conditions for the production of jadomycin B by *Streptomyces venezuelae* ISP5230: Effects of heat shock, ethanol treatment and phage infection. J. Ind. Microbiol., 13(2), 120-125.
- Ekren, G.S., 2013. Production, purification and characterization of phytase from phytase producing fungus. (M.Sc. Thesis), Adnan Menderes University, Aydın.
- El-Hofi, M., Ismail, A., Nour, M., ve Ibrahim, O., 2014. Isolation, purification and characterisation of transglutaminase from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment., 13(3), 267-278.
- Estevinho, B.N., Rocha, F., Santos, L. ve Alves, A., 2013. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications. Trends Food Sci. Tech., 31, 138-155.
- Fernández, M.J., Adrio, J.L., Piret, J.M., Wolfe, S., Ro, S. ve Demain, A.L., 1999. Stimulatory effect of growth in the presence of alcohols on biotransformation of penicillin G into cephalosporin-type antibiotics by resting cells of *Streptomyces clavuligerus* NP1. Appl. Microbiol. Biotechnol., 52, 484-488.
- Folk, J. ve Cole, P., 1966. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: Identification of a functional cysteine essential for activity. J. Biol. Chem., 241:5518-5525.
- Folk, J.E., ve Cole, P.W., 1965. Structural requirements of specific substrates for guinea pig liver transglutaminase. J. Biol. Chem., 240 (7), 2951-2960.
- Gabdrakhmanova, L., Vishniakov, I., Sharipova, M., Balaban, N., Kostrov, S. ve Leshchinskaya, I., 2005. Salt stress induction of glutamyl endopeptidase biosynthesis in *Bacillus intermedius*. Microbiol. Res., 160:233-242.
- Gaspar, A.L.C. ve Goes-Favoni, D.S.P., 2015. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. Food Chem., 171, 315-322.
- Gorman, J. ve Folk, J., 1980. Structural features of glutamine substrates for human plasma factor XIIIa (Activated blood coagulation factor XIII). J. Biol. Chem., 255:419-424.
- Griffin, M., Casadio, R. ve Bergamini, C.M., 2002. Transglutaminases: Nature's biological glues. Biochem. J., 368, 377-3962.
- Guerra-Rodríguez, E., ve Vázquez, M., 2013. Technical and economical evaluation of microbial transglutaminase production on enzymatic hydrolysates of potato (*Solanum tuberosum*). CyTA-J. Food, 11(3), 277-284.
- Guerra-Rodríguez, E., ve Vázquez, M., 2014. Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*. Chem. Eng. Res. Des., 92(4), 784-791.

- Gujral, S.H. ve Rosell, M.C., 2004. Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. *J. Cereal Sci.*, 39:225–230.
- Haq, I., Sikander, A., Qadeer, M.A. ve Javed, I., 2003. Stimulatory effect of alcohols (methanol and ethanol) on citric acid productivity by a 2-deoxy D-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* GCB-47. *Bioresource Technol.*, 86, 227–233.
- Halkman, A.K., 2005. Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları. Ed. A.K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara.
- Hasani, A., Kariminik, A., ve Issazadeh, K., 2014. Streptomycetes: characteristics and their antimicrobial activities. *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.*, 2, 63–75.
- Heck, T., Faccio, G., Richter, M. ve Thöny-Meyer, L., 2013. Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(2): 461-475.
- Henzler, H. J., ve Schedel, M., 1991. Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. *Bioprocess. Eng.*, 7(3), 123-131.
- Himabindu, M., Potumarthi, R. ve Jetty, A., 2007. Enhancement of gentamicin production by mutagenesis and non-nutritional stress conditions in *Micromonospora echinospora*. *Process Biochem.*, 42(9):1352–1356.
- Ho, M.L., Leu, S.Z., Hsieh, J.F. ve Jiang, S.T., 2000. Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from *Streptoverticillium ladakanum*. *J. Food Sci.*, 65 (1), 76-80.
- Iancu, C., Butu, N. ve Bahrim, G., 2009. Preliminary studies regarding transglutaminase synthesis by polar filamentous bacteria of the genus *Streptomyces* sp. *Innov. Rom. Food Biotechnol.*, 4, 12.
- Josten, A., Meusel, M., Spener, F. ve Haalck, L., 1999. Enzyme immobilization via microbial transglutaminase: a method for the generation of stable sensing surfaces. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 7(1-4), 57–66.
- Junqua, M., Duran, R., Gancet, C. ve Goulas, P., 1997. Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48(6), 730–734.
- Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, H., Ide, H., Motok, M. ve Shimonishi, Y., 1993. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. Strain s-8112. *J. Biol. Chem.*, 668:11565–11572.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K.I., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. ve Suzuki, E.I., 2002. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. *J. Biol. Chem.*, 277(46), 44252-44260.
- Keiser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. ve Hopwood, D.A., 2000. General introduction to actinomycete biology. In: 'Practical Streptomyces Genetics'. The John Innes Foundation, England.
- Kieliszek, M. ve Misiewicz, A., 2014. Microbial transglutaminase and its application in the food industry: A review. *Folia Microbiol.*, 59 (3), 241-250.
- Kim, E.S., Song, J.Y., Kim, D.W., Chater, K.F. ve Lee, K.J., 2008. A possible extended family of regulators of sigma factor activity in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.*, 190(22), 7559-7566.
- Kimura, T., Tomura, H., Mogi, C., Kuwabara, A., Damirin, A., Ishizuka, T. ve Murakami, M., 2006. Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 281(49), 37457-37467.

- Kuraishi, C., Yamazaki, K. ve Susa, Y., 2001. Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Rev. Int.*, 17 (2), 221-246.
- Kurt, Ş. ve Zorba, Ö., 2004. Transglutaminaz ve proteinlerin modifikasyonunda kullanımı. *Gıda/the J. Food*, 29(5).
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lages, F., Silva-Graça, M. ve Lucas, C., 1999. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology*, 145(9), 2577-2585.
- Langston, J., Blinkovsky, A., Byun, T., Terribilini, M., Ransbarger, D. ve Xu, F., 2007. Substrate specificity of *Streptomyces* transglutaminases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 136, 291–308.
- Lantto, R., 2007. Protein cross-linking with oxidative enzymes and transglutaminase: effects in meat protein systems. *VTT Publ.*, 642 , 1-114.
- Leblanc, A., Gravel, C., Labelle, J. ve Keillor, J., 2001. Kinetic studies of guinea pig liver transglutaminase reveal a general-base-catalyzed deacylation mechanism. *Biochemistry*, 40:8335-8342.
- Lee, J.S., Hah, Y.C. ve Roe, J.H., 1993. The induction of oxidative enzymes in *Streptomyces coelicolor* upon hydrogen peroxide treatment. *Microbiology*, 139(5), 1013-1018.
- Lerici, C.R. ve Manzocco, L., 2000. Biological activity of ethanol in relation to its vapour pressure. Note 1: Inactivation of polyphenoloxidase in model systems. *LWT- Food Sci. Technol.*, 33(8), 564-569.
- Li -Chan, E.C.Y., 2004. Properties of proteins in food systems: An introduction. In *Proteins in Food Processing* (R.Y. Yada, ed.), 2–26, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lin, Y.S., Chao, M.L., Liu, C.H., Tseng, M. ve Chu, W.S., 2006. Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Process Biochem.*, 41(3), 519-524.
- Lineweaver, H. ve Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, 56(3), 658-666.
- Lu, S.Y., Zhou, N.D., Tian, Y.P., Li, H.Z. ve Chen, J., 2003. Purification and properties of transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. *J. Food Biochem.*, 27(2), 109-125.
- Luciano, F.B. ve Arntfield, S.D., 2012. Use of transglutaminases in foods and potential utilization of plants as a transglutaminase source;review. *Biotemas*, 25(4):1–11.
- Mabel, M.J. ve Prapulla, S.G., 2012. Microbial transglutaminase production by *Streptomyces griseocarneus* MTCC 328 and optimization of nutritional parameters by response surface methodological approach. *Int. J. Univers. Pharm. Life Sci.*, 2(1), 64-78.
- Macedo, J. A., Sette, L. D., ve Sato, H. H. (2007). Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. *Electron. J. Biotechnol.*, 10(4), 618-626.
- Macedo, J.A., Cavallieri, A.L.F., Da Cunha, R.L. ve Sato, H.H., 2010. The effect of transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 on the gelation of acidified sodium caseinate. *Int. Dairy J.*, 20 (10), 673-679.
- Mahmood, W.A., 2013. Production of transglutaminase by a local *Streptomyces* isolate using wheat bran. *Jordan J. Agric. Sci.*, 9(1), 33-41.

- Manteca, A., Sanchez, J., Jung, H.R., Schwämmle, V. ve Jensen, O.N., 2010. Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Mol. Cell Proteomics*, 9(7), 1423-1436.
- Mariniello, L., Di Pierro, P., Giosafatto, C.V.L., Sorrentino, A. ve Porta, R., 2008. "Transglutaminase in food biotechnology". In *Recent Research Developments in Food Biotechnology. Enzymes as Additives or Processing Aids*, Edited by: Porta, R., Di Pierro, P. and Mariniello, L. 185–211. Kerala, India: Research Signpost, Fort P.O.
- Mehta, K. ve Eckert, R.L., 2005. *Transglutaminases: family of enzymes with diverse functions* (Vol. 38). Karger Medical and Scientific Publishers, USA.
- Metin, K., 2007. *Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri*. Moleküler Biyoloji (Ed; Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B.), Nobel Yayıncılık, 555-598 s, Ankara.
- Min, B. ve Green, B.W., 2008. Use of microbial transglutaminase and nonmeat proteins to improve functional properties of low NaCl, phosphate-free patties made from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) belly flap meat. *J. Food Sci.*, 73(5), 218–226.
- Mohanraj, G., ve Sekar, T., 2013. Isolation and screening of actinomycetes from marine sediments for their potential to produce antimicrobials. *Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res.*, 2(3), 115-126.
- Monogioudi, E., Faccio, G., Lille, M., Poutanen, K., Buchert, J. ve Mattinen, M.L., 2011. Effect of enzymatic cross-linking of  $\beta$ -casein on proteolysis by pepsin. *Food Hydrocoll.*, 25:71–81.
- Motoki, M. ve Seguro, K., 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci. Tech.*, 9(5), 204-210.
- Motoki, M., Okiyama, A., Nonaka, M., Tanaka, H., Uchio, R., Matura, A. ve Umeda, K., 1989. Novel transglutaminase manufacture for preparation of protein gelling compounds. *Jpn. Kokai Kokkyo Koho JP.*, 127471.
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A. ve Maneerat, S., 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(8), 1337-1345.
- Nagy, V. ve Szakacs, G., 2008. Production of transglutaminase by *Streptomyces* isolates in solid state fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.*, 47(2), 122-127.
- Nakata, K., Yoshimoto, A. ve Yamada, Y., 1999. Promotion of antibiotic production by ethanol, high NaCl concentration, or heat shock in *Pseudomonas fluorescens* S272. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 293–297.
- Negus, S.S., 2001. *A Novel Microbial Transglutarninase Derived From Streptovercillium baldaccii* (Doctoral dissertation, Griffith University).
- Ngo, K.X., Umakoshi, H., Ishi, H., Bui, H.T., Shimanouchi, T. ve Kuboi, R., 2009. Oxidative/heat stress enhanced production of chitosanase from *Streptomyces griseus* cells through its interaction with liposome. *J. Biosci. Bioeng.*, 108, 471-476.
- Ngo, K.X., Umakoshi, H., Shimanouchi, T., Jung, H.S., Morita, S. ve Kuboi, R., 2005. Heat-enhanced production of chitosanase from *Streptomyces griseus* in the presence of liposome. *J. Biosci. Bioeng.*, 100, 495-501.
- Nielsen, P.M., 1995. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase, review of literature and patents. *Food Biotech.*, 9, 119-156.



- Noda, S., Miyazaki, T., Tanaka, T., Chiaki, O. ve Kondo, A., 2013. High-level production of mature active-form *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase via pro-transglutaminase processing using *Streptomyces lividans* as a host. *Biochem. Eng. J.*, 74, 76-80.
- Nonaka, M., Toiguchi, S., Sakamoto, H., Kawajiri, H., Soeda, T. ve Motoki, M., 1994. Changes caused by microbial transglutaminase on physical properties of thermally induced soy protein gels. *Food Hydrocoll.*, 8(1), 1–8.
- Novotna, J., Vohradsky, J., Berndt, P., Gramajo, H., Langen, H., Li, X. ve Thompson, C.J., 2003. Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress induced proteins and central metabolic enzymes. *Mol. Microbiol.*, 48(5), 1289-1303.
- Özler, A., 2009. Malatya kayısısından (*Prunus armeniaca* L.) pektinesteraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Pasternack, R., Dorsch, S., Otterbach, J.T., Robonek I.R., Wolf, S. ve Fuchbauer, H.L., 1998. Bacterial pro-TGase from *Streptoverticillium mobaraense* purification, characterization and sequence of the zymogen. *Eur. J. Biochem.*, 257, 570-576.
- Payne, C.T., 2009. Enzymes. *Ingredients in Meat Products-Properties, Functionality and Applications*, Ed: R., Tarte. Springer Science Business Media, LLC, 173-197p, New York,.
- Portilla-Rivera, O.M., Téllez-Luis, S.J., Ramírez de León, J.A. ve Vázquez, M., 2009. Production of microbial transglutaminase on media made from sugar cane molasses and glycerol. *Food Technol. Biotechnol.*, 47(1), 19.
- Rattleff, S., 2013. Heterologous protein production in *Streptomyces lividans*. (Doctoral dissertation, Phd thesis), Technical University of Denmark, Denmark.
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A.W., Hopwood, D.A. ve Van Wezel, G.P., 2008. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO reports*, 9(7), 670-675.
- Romeih, E. ve Walker, G., 2017. Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application. *Trends Food Sci. Tech.*, 62, 133-140.
- Ryszka, L., Krakowiak, A., Trzcinska, M. ve Czajak, J., 2009. Effect of culture conditions on biosynthesis of transglutaminase by *Streptoverticillium mobaraense*. *Pamiętnik Puławski*, 151(2).
- Schnell, S. ve Maini, P.K., 2003. A century of enzyme kinetics. Should we believe in the  $K_m$  and  $v_{max}$  estimates. *Comments in Theoretical Biology*, 8(2-3), 169-187.
- Schoolfield, R.M., Sharpe, P.J.H. ve Magnuson, C.E., 1981. Non-linear regression of biological temperature-dependent rate models based on absolute reaction-rate theory. *J. Theor. Biol.*, 88(4), 719-731.
- Schorsch, C., Carrie H. ve Norton I.T., 2000. Crosslinking casein micelles by a microbial transglutaminase: Influence of crosslinks in acid-induced gelation. *Int. Dairy J.*, 10, 529-539.
- Schulz, A.R., 1994. *Enzyme kinetics: from diastase to multi-enzyme systems*. Cambridge University Press, England.
- Sobieszczuk-Nowicka, E., Krzesłowska, M. ve Legocka, J., 2008. Transglutaminases and their substrates in kinetin-stimulated etioplast-to-chloroplast transformation in cucumber cotyledons. *Protoplasma*, 233(3–4):187–194.

- Souza, C.F.De., Flôres, S.H., ve Ayub, M.A.Z., 2006. Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. *Process Biochem.*, 41(5), 1186-1192.
- Suzuki, S.I., Izawa, Y., Kobayashi, K., Eto, Y., Yamanaka, S., Kubota, K. ve Yokozeki, K., 2000. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(11), 2344-2351.
- Télez-Luis, S.J., González-Cabriales, J.J., Ramírez, J.A. ve Vázquez, M., 2004a. Production of transglutaminase by *Streptovercillium ladakanum* NRRL-3191 grown on media made from hydrolysates of sorghum straw. *Food Technol. Biotechnol.*, 42, 1-4.
- Télez-Luis, S.J., Ramírez, J.A. ve Vázquez, M., 2004b. Production of transglutaminase by *Streptovercillium ladakanum* NRRL-3191 using glycerol as carbon source. *Food Technol. Biotechnol.*, 42(2), 75-81.
- Tominaga, J., Kemori, Y., Tanaka, Y., Maruyama, T., Kamiya, N. ve Goto, M., 2007. An enzymatic method for site-specific labeling of recombinant proteins with oligonucleotides. *Chem. Commun.*, (4), 401-403.
- Tsai, G.J., Lin, S.M. ve Jiang, S.T., 1996. Transglutaminase from *Streptovercillium ladakanum* and application to minced fish product. *J. Food Sci.*, 61(6), 1234-1238.
- Umakoshi, H., Kuboi, R., Komasa, I., Tsuchido, T. ve Matsumura, Y., 1998. Heat-induced translocation of cytoplasmic  $\beta$ -galactosidase across inner membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.*, 14, 210-217.
- Villalobos, E., Santos, M., Talavera, D., Rodríguez-Falcón, M. ve Torné, J., 2004. Molecular cloning and characterization of a maize transglutaminase complementary DNA. *Gene*, 336(1), 93-104.
- Völker, U., Mach, H., Schmid, R. ve Hecker, M., 1992. Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 138(10), 2125-2135.
- Wang, C., Long, X., Mao, X., Dong, H., Xu, L. ve Li, Y., 2010. SigN is responsible for differentiation and stress responses based on comparative proteomic analyses of *Streptomyces coelicolor* wild-type and sigN deletion strains. *Microbiol. Res.*, 165(3), 221-231.
- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T. ve Moo-Young, M., 2005. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations.. *Biotechnol. Adv.*, 23(2), 115-129.
- Whitaker, A., 1980. Fed-batch culture. *Process Biochem.*, 15(4), 10-18.
- Williams, S., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E., Sneath, P. ve Sackin, M., 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 1743-1813.
- Xu, X., Zhang, D., Wang, M., Li, J., Chen, J. ve Du, G., 2009. Improvement of MTG production by fed-batch fermentation. *China Biotechnol.*,
- Yan, G., Du, G., Li, Y., Chen, J., ve Zhong, J., 2005. Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptovercillium mobaraense*: application of a two-stage agitation speed control strategy. *Process Biochem.*, 40(2), 963-968.
- Yildirim, M. ve Hettiarachchy, N., 1998. Properties of films produced by Cross-linking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase. *J. Food Sci.*, 63(2), 248-252.

- Yokoyama, K., Nio, N. ve Kikuchi, Y., 2004. Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64(4), 447-454.
- Yüksel, Z. ve Erdem, Y.K., 2007. Gıda endüstrisinde transglutaminaz uygulamaları: 1-Enzimin genel özellikleri. *Gıda*, 32 (6), 287-292.
- Zhang, D., Wang, M., Du, G., Zhao, Q., Wu, J. ve Chen, J., 2008a. Surfactant protein of the *Streptomyces subtilisin* inhibitor family inhibits transglutaminase activation in *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Agr. Food Chem.*, 56: 3403–3408.
- Zhang, D., Wang, M., Du, G., Zhao, Q., Wu, J. ve Chen, J., 2008b. Two different proteases from *Streptomyces hygroscopicus* are involved in transglutaminase activation. *J. Agr. Food. Chem.*, 56: 10261–10264.
- Zhang, D., Zhu, Y. ve Chen, J., 2009. Microbial transglutaminase production: Understanding the mechanism. *Biotechnol. Genet. Eng.*, 26 (1), 205-222.
- Zhang, L., Yi, H., Du, M., Ma, C., Han, X., Feng, Z. ve Zhang, Y., 2012c. Enzymatic characterization of transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 in high salt and effect of enzymatic cross-linking of yak milk proteins on functional properties of stirred yogurt. *J. Dairy Sci.*, 95(7), 3559-3568.
- Zhang, L., Zhang, L., Han, X., Du, M., Zhang, Y., Feng, Z. ve Zhang, Y., 2012a. Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* as achieved by treatment with excessive MgCl<sub>2</sub>. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93(6), 2335-2343.
- Zhang, L., Zhang, L., Yi, H., Du, M., Zhang, Y., Han, X., Feng, Z., Li, J., Jiao, Y., Zhang, Y. ve Guo, C., 2012b. Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 by non-nutritional stress conditions: Effects of heat shock, alcohols, and salt treatments. *Korean J. Chem. Eng.*, 29, 913-917.
- Zheng, M., Du, G. ve Chen, J., 2002a. pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptoverticillium mobaraense*. *Enzyme Microb. Technol.*, 31(4), 477-481.
- Zheng, M., Du, G., Chen, J. ve Lun, S., 2002b. Modelling of temperature effects on batch microbial transglutaminase fermentation with *Streptoverticillium mobaraense*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18(8), 767-771.
- Zheng, M., Du, G., Guo, W. ve Chen, J., 2001. A temperature-shift strategy in batch microbial transglutaminase fermentation. *Process Biochem.*, 36(6), 525-530.
- Zhu, Y. ve Tramper, J., 2008. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. *Trends Biotechnol.*, 26(10):559–565.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J. ve Bol, J., 1995. Microbial transglutaminase: a review of its production and application in food processing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44(3-4), 277-282.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J. ve Bol, J., 1996. Medium design based on stoichiometric analysis of microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*. *Biotech. Bioeng.*, 50(3), 291-298.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J., Bruin, E.D. ve Bol, J., 1998. Fed-batch fermentation dealing with nitrogen limitation in microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 49, 251-257.
- Zilda, D. Z., 2014. Microbial transglutaminase: source, production and its role to improve surimi properties. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 9(1), 35-44.

Zotzel, J., Keller, P., Fuchsbauer, H.L., 2003. Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. Eur. J. Biochem., 270, 3214-3222.



## 7. EKLER

Çizelge EK-A.1. GNB besiyerinde farklı pH ve sıcaklıklarda belirlenen enzim aktiviteleri (U/ml) .....	111
Çizelge EK-A.2. GNB besiyerinde farklı pH ve sıcaklıklarda belirlenen spesifik enzim aktiviteleri (U/g protein) .....	112
Çizelge EK-A.3. MIX besiyerinde farklı pH ve sıcaklıklarda belirlenen enzim aktiviteleri (U/ml) .....	113
Çizelge EK-A.4. MIX besiyerinde farklı pH ve sıcaklıklarda belirlenen spesifik enzim aktiviteleri (U/g protein) .....	114
Çizelge EK-B.1. Çalkalamalı (orbital) inkübatörde (30°C, pH 6.0) enzim üretim denemelerine ait aktivite değerleri (U/ml).....	115
Çizelge EK-B.2. Çalkalamalı (orbital) inkübatörde (30°C, pH 6.0) enzim üretim denemelerine ait spesifik aktivite değerleri (U/g protein) .....	115
Çizelge EK-C.1. Fermentörde farklı karıştırma hızlarında elde edilen aktivite (U/ml) ve biyokütle (g/l) değerleri.....	116
Çizelge EK-C.2. Fermentörde farklı karıştırma hızlarında elde edilen spesifik aktivite değerleri (U/g protein) .....	117
Çizelge EK-C.3. Fermentörde farklı hava akış hızlarında elde edilen enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle (g/l) değerleri .....	118
Çizelge EK-D.1. Farklı süre (1-5 dak.) ve sıcaklıklarda (50-60°C) uygulanan stres şartlarında enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle (g/l) değerleri. ....	119
Çizelge EK-D.2. Farklı alkol stres şartlarında enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle (g/l) değerleri.....	120
Çizelge EK-D.3. Farklı tuz stres şartlarında enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle (g/l) değerleri.....	121
Çizelge EK-D.4. Farklı konsantrasyonlarda EDTA ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> şartlarında enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle (g/l) değerleri. ....	122
Çizelge EK-D.5. Pepsin ve Tripsin enzim ilave edilmiş besiyerinde enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle (g/l) değerleri .....	123
Çizelge EK-E.1. Farklı tuz doygunluk koşullarında çöktürme sonrası enzim aktivitesi (U/ml) değerleri.....	124
Çizelge EK-E.2. Farklı alkol konsantrasyonlarında çöktürme sonrası enzim aktivitesi (U/ml) değerleri.....	125
Çizelge EK-F.1. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim stabilitesine sıcaklığın etkisi .....	126
Çizelge EK-F.2. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim stabilitesine pH'nın etkisi.....	127
Çizelge EK-F.3. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim aktivitesine metal iyonları ve EDTA'nın etkisi.....	127

## EK-A

Çizelge EK-A.1. GNB besiyerinde farklı pH ve sıcaklıklarda belirlenen enzim aktiviteleri (U/ml)

Süre (gün)	Sıcaklık (°C)	Aktivite (U/ml)								
		pH 6.0			pH 7.0			pH 8.0		
		1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama	1. tekerrür	2. Tekerrür	Ortalama	1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama
3	20	0.001	0.001	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	30	0.004	0.002	0.003 (±0.001)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	40	0.003	0.004	0.003 (±0.001)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	20	0.002	0.003	0.003 (±0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	30	0.008	0.007	0.007 (±0.000)	0.001	0.001	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd
	40	0.005	0.006	0.005 (±0.001)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	20	0.004	0.004	0.004 (±0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	30	0.010	0.011	0.011 (±0.001)	0.002	0.002	0.002 (±0.000)	nd	nd	nd
	40	0.007	0.011	0.009 (±0.002)	0.001	0.001	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd
9	20	0.005	0.005	0.005 (±0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	30	0.017	0.019	0.018 (±0.001)	0.003	0.003	0.003 (±0.000)	nd	nd	nd
	40	0.013	0.017	0.015 (±0.002)	0.001	0.001	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd
11	20	0.005	0.006	0.005 (±0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	30	0.018	0.021	0.019 (±0.002)	0.006	0.007	0.007 (±0.000)	nd	nd	nd
	40	0.012	0.017	0.015 (±0.003)	0.001	0.001	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd
14	20	0.006	0.007	0.006 (±0.000)	0.000	0.001	0.000 (±0.000)	nd	nd	nd
	30	0.036	0.036	0.036 (±0.000)	0.011	0.008	0.010 (±0.002)	nd	nd	nd
	40	0.022	0.026	0.024 (±0.002)	0.000	0.003	0.002 (±0.001)	nd	nd	nd
28	20	0.003	0.002	0.003 (±0.000)	0.000	0.001	0.001 (±0.000)	0.002	0.001	0.001 (±0.000)
	30	0.011	0.010	0.011 (±0.001)	0.009	0.011	0.010 (±0.001)	nd	nd	nd
	40	0.001	0.004	0.003 (±0.001)	0.000	0.003	0.002 (±0.001)	nd	nd	nd

nd: ölçüm limitlerinin (<0.001 U/ml) altındadır.

Çizelge EK-A.2. GNB besiyerinde farklı pH ve sıcaklıklarda belirlenen spesifik enzim aktiviteleri (U/g protein)

Süre (gün)	Sıcaklık (°C)	Aktivite (U/g protein)								
		pH 6.0			pH 7.0			pH 8.0		
		1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama	1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama	1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama
3	20	52.50	55.43	53.97 (±1.47)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	30	169.92	134.18	152.05 (±17.87)	10.29	14.89	12.59 (±2.30)	nd	nd	nd
	40	119.67	151.77	135.72 (±16.05)	5.53	3.98	4.75 (±0.77)	nd	nd	nd
5	20	105.96	169.69	137.82 (±31.87)	2.05	4.94	3.49 (±1.45)	nd	nd	nd
	30	281.81	222.53	252.17 (±29.64)	33.06	46.07	39.56 (±6.50)	nd	nd	nd
	40	142.22	104.73	123.48 (±18.74)	11.00	12.93	11.96 (±0.96)	nd	nd	nd
7	20	161.12	158.07	159.59 (±1.52)	nd	4.93	2.40 (±2.52)	nd	nd	nd
	30	290.64	368.65	329.64 (±39.01)	61.66	75.99	68.83 (±7.17)	12.37	9.87	11.12 (±1.25)
	40	188.31	214.76	201.54 (±13.22)	23.36	13.87	18.61 (±4.74)	12.04	13.49	12.76 (±0.72)
9	20	223.66	222.48	223.07 (±0.59)	5.59	8.39	6.99 (±1.40)	nd	nd	nd
	30	396.45	444.99	420.72 (±24.27)	87.79	89.86	88.82 (±1.03)	nd	nd	nd
	40	289.54	318.71	304.13 (±14.59)	17.51	16.13	16.82 (±0.69)	nd	nd	nd
11	20	208.56	242.57	225.56 (±17.01)	6.00	11.83	8.92 (±2.91)	nd	nd	nd
	30	447.27	498.43	472.85 (±25.58)	147.03	144.23	145.63 (±1.40)	nd	4.64	nd
	40	289.84	343.64	316.74 (±26.90)	29.37	37.06	33.21 (±3.84)	nd	1.23	nd
14	20	287.54	279.34	283.44 (±4.10)	17.39	25.59	21.49 (±4.10)	nd	nd	nd
	30	716.08	716.08	716.08 (±0.00)	234.19	199.35	216.77 (±17.42)	nd	nd	nd
	40	426.83	407.95	417.39 (±9.44)	2.54	62.57	32.55 (±30.01)	nd	5.81	1.35 (±4.46)
28	20	153.45	111.03	132.24 (±21.21)	22.91	37.53	30.22 (±7.31)	63.96	35.30	49.63 (±14.33)
	30	253.01	210.10	231.56 (±21.45)	181.29	212.38	196.83 (±15.55)	11.43	6.85	9.14 (±2.29)
	40	29.82	70.40	50.11 (±20.29)	4.69	75.21	39.95 (±35.26)	8.91	9.55	9.23 (±0.32)

nd: ölçüm limitlerinin (<0.001 U/ml) altındadır.

Çizelge EK-A.3. MIX besiyerinde farklı pH ve sıcaklıklarda belirlenen enzim aktiviteleri (U/ml)

Süre (gün)	Sıcaklık (°C)	Aktivite (U/ml)								
		pH 6.0			pH 7.0			pH 8.0		
		1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama	1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama	1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama
3	20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	30	0.001	0.001	0.001 (±0.000)	0.001	0.000	0.000 (±0.000)	nd	nd	nd
	40	0.001	0.000	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	20	0.001	0.000	0.000 (±0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	30	0.003	0.003	0.003 (±0.000)	0.001	0.000	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd
	40	0.002	0.002	0.002 (±0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	20	0.002	0.003	0.002 (±0.000)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	30	0.004	0.006	0.005 (±0.001)	0.002	0.001	0.001 (±0.001)	nd	nd	nd
	40	0.004	0.004	0.004 (±0.000)	0.000	0.001	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd
9	20	0.006	0.004	0.005 (±0.001)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	30	0.006	0.008	0.007 (±0.001)	0.003	0.000	0.002 (±0.001)	nd	nd	nd
	40	0.004	0.005	0.005 (±0.000)	0.001	0.001	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd
11	20	0.007	0.005	0.006 (±0.001)	0.000	0.001	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd
	30	0.009	0.010	0.010 (±0.001)	0.004	0.001	0.002 (±0.002)	nd	nd	nd
	40	0.004	0.005	0.005 (±0.000)	0.001	0.001	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd
14	20	0.006	0.005	0.006 (±0.001)	0.000	0.001	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd
	30	0.022	0.018	0.020 (±0.002)	0.007	0.003	0.005 (±0.000)	nd	nd	nd
	40	0.003	0.005	0.004 (±0.001)	0.001	0.001	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd
28	20	0.004	0.002	0.003 (±0.001)	0.001	0.002	0.001 (±0.001)	nd	nd	nd
	30	0.012	0.014	0.013 (±0.001)	0.004	0.003	0.004 (±0.001)	nd	nd	nd
	40	0.002	0.003	0.002 (±0.001)	0.001	0.001	0.001 (±0.000)	nd	nd	nd

nd: ölçüm limitlerinin (<0.001 U/ml) altındadır.



Çizelge EK-A.4. MIX besiyerinde farklı pH ve sıcaklıklarda belirlenen spesifik enzim aktiviteleri (U/g protein)

Süre (gün)	Sıcaklık (°C)	Aktivite (U/g protein)								
		pH 6.0			pH 7.0			pH 8.0		
		1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama	1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama	1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama
3	20	1.33	4.25	2.79 (±1.46)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	30	66.93	33.26	50.10 (±16.83)	21.32	4.80	13.06 (±8.26)	nd	nd	nd
	40	36.53	4.85	20.69 (±15.84)	14.04	6.60	10.32 (±3.72)	nd	nd	nd
5	20	18.43	10.00	14.22 (±4.22)	1.20	1.31	1.25 (±0.05)	nd	nd	nd
	30	87.78	89.39	88.59 (±0.80)	32.40	8.65	20.53 (±11.87)	nd	nd	nd
	40	71.56	61.02	66.29 (±5.27)	8.59	12.52	10.55 (±1.97)	nd	nd	nd
7	20	93.72	87.80	90.76 (±2.96)	4.70	6.52	5.61 (±0.91)	nd	2.72	1.79 (±0.93)
	30	146.38	181.20	163.79 (±17.41)	55.93	17.45	36.69 (±19.24)	7.61	5.71	6.66 (±0.95)
	40	95.84	96.04	95.94 (±0.10)	13.23	20.21	16.72 (±3.49)	nd	nd	nd
9	20	169.12	135.25	152.18 (±16.94)	4.49	10.39	7.44 (±2.95)	nd	nd	nd
	30	190.84	225.08	207.96 (±17.12)	70.39	9.07	39.73 (±30.66)	nd	nd	nd
	40	107.39	117.64	112.52 (±5.13)	17.51	20.20	18.85 (±1.35)	nd	nd	nd
11	20	265.46	171.02	218.24 (±47.22)	11.40	19.20	15.30 (±3.90)	nd	nd	nd
	30	251.99	262.82	257.41 (±5.41)	105.84	12.19	59.02 (±46.82)	nd	nd	nd
	40	98.73	124.15	111.44 (±12.71)	31.12	23.93	27.53 (±3.59)	nd	nd	nd
14	20	209.46	151.66	180.56 (±28.90)	9.91	33.69	21.80 (±11.89)	nd	nd	nd
	30	493.38	399.73	446.55 (±46.83)	164.72	52.14	108.43 (±56.29)	nd	nd	nd
	40	61.30	100.54	80.92 (±19.62)	28.40	22.41	25.40 (±3.00)	nd	nd	nd
28	20	135.10	85.13	110.12 (±24.98)	10.44	48.45	29.44 (±19.01)	4.72	4.47	4.59 (±0.12)
	30	285.10	282.23	283.66 (±1.43)	96.43	56.20	76.31 (±20.12)	10.93	3.67	7.30 (±3.36)
	40	37.51	66.77	52.14 (±14.63)	18.70	20.81	19.76 (±1.06)	4.59	nd	2.71 (±1.87)

nd: ölçüm limitlerinin (<0.001 U/ml) altındadır.

## EK-B

Çizelge EK-B.1. Çalkalamalı (orbital) inkübatörde (30°C, pH 6.0) enzim üretim denemelerine ait aktivite değerleri (U/ml)

Süre (gün)	100 rpm			150 rpm			200 rpm		
	1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama	1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama	1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama
2	0.027	0.031	0.029 ( $\pm 0.002$ )	0.051	0.051	0.051 ( $\pm 0.000$ )	0.018	0.018	0.018 ( $\pm 0.000$ )
4	0.065	0.069	0.067 ( $\pm 0.002$ )	0.127	0.127	0.127 ( $\pm 0.000$ )	0.056	0.054	0.055 ( $\pm 0.001$ )
6	0.047	0.063	0.055 ( $\pm 0.008$ )	0.138	0.132	0.135 ( $\pm 0.003$ )	0.067	0.055	0.061 ( $\pm 0.006$ )
8	0.040	0.039	0.040 ( $\pm 0.001$ )	0.077	0.090	0.083 ( $\pm 0.006$ )	0.037	0.014	0.026 ( $\pm 0.011$ )
10	0.040	0.037	0.038 ( $\pm 0.002$ )	0.043	0.074	0.058 ( $\pm 0.016$ )	0.014	0.005	0.009 ( $\pm 0.005$ )

Çizelge EK-B.2. Çalkalamalı (orbital) inkübatörde (30°C, pH 6.0) enzim üretim denemelerine ait spesifik aktivite değerleri (U/g protein)

Süre (gün)	100 rpm			150 rpm			200 rpm		
	1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama	1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama	1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama
2	449.33	505.69	477.51 ( $\pm 39.85$ )	842.71	845.19	843.95 ( $\pm 1.75$ )	303.67	307.96	305.82 ( $\pm 3.04$ )
4	1027.92	1079.66	1053.79 ( $\pm 36.59$ )	1974.96	1968.91	1971.93 ( $\pm 4.28$ )	895.67	852.52	874.09 ( $\pm 30.51$ )
6	733.33	950.40	841.87 ( $\pm 153.49$ )	2000.73	1911.07	1955.90 ( $\pm 63.39$ )	1033.79	855.89	944.84 ( $\pm 125.80$ )
8	601.36	578.00	589.68 ( $\pm 16.52$ )	1006.22	1140.06	1073.14 ( $\pm 94.64$ )	552.74	216.72	384.73 ( $\pm 237.60$ )
10	578.37	532.48	555.42 ( $\pm 32.44$ )	489.54	830.84	660.19 ( $\pm 241.33$ )	324.00	245.00	284.50 ( $\pm 55.86$ )

## EK-C

Çizelge EK-C.1. Fermentörde farklı karıştırma hızlarında elde edilen aktivite (U/ml) ve biyokütle (g/l) değerleri

Süre (gün)	Karıştırma Hızı (rpm)	Aktivite (U/ml)			Biyokütle (g/l)
		1.tekerrür	2.tekerrür	Ortalama	Ortalama
1	200	0.003	0.002	0.002 (±0.000)	2.00 (±0.00)
	400	0.027	0.004	0.016 (±0.011)	4.50 (±1.00)
	500	0.002	0.057	0.029 (±0.028)	3.75 (±0.25)
	600	0.003	0.022	0.013 (±0.010)	2.75 (±0.25)
	800	0.013	0.010	0.012 (±0.001)	6.00 (±0.50)
	1000	0.022	nd	0.011 (±0.011)	3.00 (±0.00)
2	200	0.036	0.046	0.041 (±0.005)	4.00 (±0.00)
	400	0.195	0.172	0.183 (±0.012)	9.00 (±1.00)
	500	0.270	0.312	0.291 (±0.021)	10.50 (±0.50)
	600	0.316	0.275	0.296 (±0.020)	11.50 (±0.50)
	800	0.174	0.183	0.178 (±0.004)	8.25 (±0.25)
	1000	0.186	0.148	0.167 (±0.019)	10.50 (±0.50)
3	200	0.059	0.069	0.064 (±0.005)	2.50 (±0.50)
	400	0.230	0.233	0.232 (±0.002)	10.75 (±0.25)
	500	0.436	0.410	0.423 (±0.013)	12.50 (±0.50)
	600	0.353	0.325	0.339 (±0.014)	9.00 (±0.50)
	800	0.201	0.206	0.203 (±0.003)	9.00 (±0.50)
	1000	0.081	0.037	0.059 (±0.022)	13.50 (±0.50)
4	200	0.078	0.108	0.093 (±0.015)	6.00 (±0.00)
	400	0.206	0.175	0.191 (±0.016)	13.75 (±0.75)
	500	0.403	0.403	0.403 (±0.000)	17.25 (±0.75)
	600	0.224	0.169	0.196 (±0.028)	9.00 (±0.00)
	800	0.133	0.142	0.138 (±0.004)	10.00 (±1.00)
	1000	0.023	0.022	0.022 (±0.000)	18.00 (±1.00)
5	200	0.095	0.106	0.101 (±0.005)	6.50 (±0.50)
	400	0.155	0.124	0.139 (±0.015)	24.75 (±2.25)
	500	0.341	0.335	0.338 (±0.003)	24.75 (±2.25)
	600	0.191	0.133	0.162 (±0.029)	11.50 (±0.50)
	800	0.050	0.079	0.064 (±0.015)	12.00 (±1.00)
	1000	0.007	0.018	0.013 (±0.006)	19.50 (±0.50)

nd: ölçüm limitlerinin (<0.001 U/ml) altındadır.

Çizelge EK-C.2. Fermentörde farklı karıştırma hızlarında elde edilen spesifik aktivite değerleri (U/g protein)

Süre (gün)	Karıştırma Hızı (rpm)	Spesifik Aktivite (U/g protein)		
		1.tekerrür	2.tekerrür	Ortalama
1	200	270.285	74.637	172.46 (±97.82)
	400	687.939	151.028	419.48 (±268.46)
	500	813.540	869.960	841.75 (±28.21)
	600	71.822	545.004	308.41 (±236.59)
	800	331.807	257.402	294.60 (±37.20)
	1000	368.871	nd	163.68 (±205.19)
	2	200	1159.697	1260.483
400		3541.509	3611.164	3576.34 (±34.83)
500		4663.890	4501.080	4582.49 (±81.41)
600		6278.476	5474.900	5876.69 (±401.79)
800		2709.593	2849.760	2779.68 (±70.08)
1000		1126.959	594.646	2515.55 (±142.73)
3		200	1356.963	1705.734
	400	3914.233	4461.885	4188.06 (±273.83)
	500	6856.170	5478.210	6167.19 (±688.98)
	600	6203.524	5620.429	5911.98 (±291.55)
	800	3457.756	3546.419	3502.09 (±44.33)
	1000	2658.283	2372.824	860.80 (±266.16)
	4	200	1623.163	2348.938
400		3384.028	2920.739	3152.38 (±231.64)
500		5803.040	4458.400	5130.72 (±672.32)
600		3476.200	2499.843	2988.02 (±488.18)
800		2199.710	2346.401	2273.06 (±73.35)
1000		306.179	343.250	324.71 (±18.54)
5		200	1697.751	2505.110
	400	2528.373	2023.534	2275.95 (±252.42)
	500	4752.730	4540.620	4646.68 (±106.06)
	600	2985.543	2082.338	2533.94 (±451.60)
	800	796.901	1264.386	1030.64 (±233.74)
	1000	105.386	269.996	187.69 (±82.31)

nd: ölçüm limitlerinin (<0.001 U/ml) altındadır.

Çizelge EK-C.3. Fermentörde farklı hava akış hızlarında elde edilen enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle (g/l) değerleri

Süre (gün)	Hava Akışı (cm <sup>3</sup> /dak)	Aktivite (U/ml)			Spesifik Aktivite (U/g protein)			Biyokütle (g/l)
		1.Tekerrür	2.Tekerrür	Ortalama	1.Tekerrür	2.Tekerrür	Ortalama	Ortalama
1	2	0.0000	0.0076	0.0038 (±0.0038)	0.000	130.502	65.251 (±65.251)	3.75 (±0.25)
	6	0.0872	0.0000	0.0436 (±0.0435)	1325.842	0.000	662.921 (±662.921)	3.50 (±1.00)
	10	0.0572	0.0016	0.0294 (±0.0278)	612.492	813.543	713.017 (±100.525)	8.25 (±0.75)
2	2	0.2369	0.2961	0.2665 (±0.0296)	3399.486	4043.180	3721.333 (±321.847)	10.50 (±0.50)
	6	0.2818	0.2790	0.2804 (±0.0014)	4066.423	3546.585	3806.504 (±259.919)	12.00 (±0.50)
	10	0.3118	0.2702	0.2910 (±0.0208)	6168.298	4663.892	5416.095 (±752.203)	14.000 (±1.00)
3	2	0.2584	0.2524	0.2554 (±0.0030)	3535.630	3319.724	3427.677 (±107.953)	12.50 (±0.50)
	6	0.3438	0.3048	0.3243 (±0.0195)	4660.462	4021.843	4341.152 (±319.310)	15.25 (±0.25)
	10	0.4103	0.4357	0.4230 (±0.0127)	8721.444	6856.166	7788.805 (±932.639)	18.00 (±1.00)
4	2	0.1545	0.2108	0.1826 (±0.0281)	2156.148	2829.156	2492.652 (±336.504)	17.25 (±0.75)
	6	0.2717	0.2373	0.2545 (±0.0172)	3778.652	3277.924	3528.288 (±250.364)	20.00 (±0.50)
	10	0.4032	0.4032	0.4032 (±0.000)	7209.689	5803.036	6506.362 (±703.327)	26.75 (±0.75)
5	2	0.0924	0.2020	0.1472 (±0.0548)	1338.585	2833.378	2085.982 (±747.396)	24.75 (±2.25)
	6	0.1708	0.1551	0.1630 (±0.0078)	2468.193	2237.462	2352.827 (±115.366)	29.00 (±0.00)
	10	0.3348	0.3405	0.3377 (±0.0028)	5842.332	4752.730	5297.531 (±544.801)	37.25 (±1.25)

## EK-D

Çizelge EK-D.1. Farklı süre (1-5 dak.) ve sıcaklıklarda (50-60°C) uygulanan stres şartlarında enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle (g/l) değerleri.

İnkübasyon (gün)	Uygulama sıcaklığı (°C)	Uygulama süresi (dak.)	Enzim aktivitesi (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/g protein)	Biyokütle (g/l)
2	60°C	1 dak	0.02 (±0.000)	310 (±5.18)	10.58 (±0.02)
		5 dak	0.02 (±0.000)	294 (±7.66)	12.53 (±0.02)
	50°C	1 dak	0.02 (±0.001)	290 (±16.93)	10.28 (±0.08)
		5 dak	0.02 (±0.001)	286 (±9.89)	9.95 (±0.55)
	Kontrol		0.02 (±0.001)	298 (±19.16)	11.15 (±0.35)
3	60°C	1 dak	0.10 (±0.002)	1501 (±22.49)	11.50 (±0.20)
		5 dak	0.10 (±0.006)	1550 (±94.72)	12.75 (±0.20)
	50°C	1 dak	0.10 (±0.001)	1498 (±13.54)	11.70 (±0.25)
		5 dak	0.10 (±0.000)	1537 (±2.70)	11.25 (±0.15)
	Kontrol		0.10 (±0.002)	1556 (±33.24)	13.20 (±0.30)
4	60°C	1 dak	0.05 (±0.009)	748 (±132.02)	13.85 (±0.20)
		5 dak	0.02 (±0.003)	361 (±57.78)	14.10 (±0.50)
	50°C	1 dak	0.09 (±0.002)	1374 (±69.93)	12.13 (±0.18)
		5 dak	0.08 (±0.005)	1192 (±40.65)	12.95 (±0.45)
	Kontrol		0.11 (±0.004)	1721 (±37.73)	15.50 (±0.40)
5	60°C	1 dak	0.10 (±0.012)	1488 (±188.16)	16.95 (±0.25)
		5 dak	0.03 (±0.008)	471 (±114.40)	14.13 (±0.18)
	50°C	1 dak	0.15 (±0.005)	2237 (±69.69)	16.88 (±0.13)
		5 dak	0.14 (±0.003)	2062 (±53.14)	16.15 (±0.25)
	Kontrol		0.16 (±0.003)	2449 (±47.20)	18.05 (±0.15)
6	60°C	1 dak	0.11 (±0.008)	1605 (±104.15)	18.05 (±0.45)
		5 dak	0.07 (±0.003)	670 (±104.94)	16.95 (±0.10)
	50°C	1 dak	0.13 (±0.006)	1755 (±86.70)	18.20 (±0.25)
		5 dak	0.13 (±0.009)	1779 (±122.89)	17.95 (±0.05)
	Kontrol		0.15 (±0.007)	2038 (±96.52)	19.55 (±0.35)
8	60°C	1 dak	0.09 (±0.008)	1208 (±110.94)	23.15 (±0.50)
		5 dak	0.07 (±0.003)	938 (±37.18)	22.98 (±0.13)
	50°C	1 dak	0.09 (±0.008)	1235 (±108.08)	26.45 (±0.25)
		5 dak	0.12 (±0.003)	1640 (±30.72)	25.60 (±1.20)
	Kontrol		0.10 (±0.002)	1369 (±30.53)	26.70 (±0.40)
10	60°C	1 dak	0.08 (±0.004)	1125 (±11.11)	30.00 (±0.80)
		5 dak	0.08 (±0.021)	960 (±21.23)	26.30 (±0.15)
	50°C	1 dak	0.07 (±0.009)	1002 (±30.14)	29.53 (±0.03)
		5 dak	0.12 (±0.000)	1540 (±44.12)	30.30 (±0.20)
	Kontrol		0.09 (±0.000)	1220 (±51.60)	34.35 (±0.45)

Çizelge EK-D.2. Farklı alkol stres şartlarında enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle (g/l) değerleri.

Alkol	İnkübasyon (gün)	Enzim aktivitesi (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/g protein)	Biyokütle (g/l)
Metanol (%1)	2	0.066 (±0.000)	1103 (±0.31)	10.25 (±0.25)
	4	0.097 (±0.002)	1498 (±27.29)	13.50 (±0.00)
	6	0.142 (±0.004)	1999 (±60.64)	17.75 (±0.25)
	8	0.116 (±0.010)	1529 (±122.99)	25.00 (±0.50)
	10	0.110 (±0.011)	1279 (±143.35)	31.75 (±0.75)
Metanol (%2)	2	0.079 (±0.001)	1315 (±9.00)	11.98 (±0.23)
	4	0.086 (±0.004)	1306 (±57.47)	16.00 (±0.50)
	6	0.127 (±0.000)	1782 (±2.36)	20.90 (±0.05)
	8	0.101 (±0.008)	1344 (±103.85)	27.65 (±0.05)
	10	0.100 (±0.001)	1183 (±7.82)	32.23 (±0.07)
Etanol (%1)	2	0.073 (±0.003)	1211 (±50.85)	10.06 (±0.11)
	4	0.056 (±0.011)	851 (±172.47)	13.43 (±0.18)
	6	0.085 (±0.011)	1192 (±155.49)	18.13 (±0.18)
	8	0.086 (±0.012)	1150 (±153.84)	25.80 (±0.40)
	10	0.087 (±0.012)	1031 (±152.31)	32.92 (±0.38)
Etanol (%2)	2	0.006 (±0.000)	106 (±2.45)	5.75 (±0.00)
	4	0.009 (±0.001)	135 (±7.79)	8.00 (±0.00)
	6	0.013 (±0.001)	178 (±20.90)	10.70 (±0.00)
	8	0.018 (±0.002)	242 (±30.43)	12.60 (±0.00)
	10	0.020 (±0.004)	237 (±44.33)	12.30 (±0.00)
Kontrol	2	0.066 (±0.000)	1093 (±1.56)	10.40 (±0.30)
	4	0.105 (±0.005)	1618 (±72.26)	16.13 (±0.18)
	6	0.161 (±0.001)	2267 (±25.09)	20.20 (±0.25)
	8	0.133 (±0.010)	1755 (±125.00)	32.45 (±0.25)
	10	0.125 (±0.011)	1454 (±102.83)	36.85 (±0.50)

Çizelge EK-D.3. Farklı tuz stres şartlarında enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle (g/l) değerleri

Tuz	Konsantrasyon (mol/l)	İnkübasyon (gün)	Enzim aktivitesi (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/g protein)	Biyokütle (g/l)
NaCl	0.05	2	0.042 (±0.001)	706 (±7.18)	11.98 (±0.25)
		4	0.084 (±0.008)	1295 (±112.41)	16.00 (±0.00)
		6	0.099 (±0.008)	1396 (±110.23)	20.90 (±0.25)
		8	0.065 (±0.003)	857 (±49.13)	30.65 (±0.50)
		10	0.043 (±0.007)	509 (±83.61)	35.23 (±0.75)
	0.10	2	0.036 (±0.003)	602 (±45.23)	10.46 (±0.01)
		4	0.077 (±0.006)	1181 (±83.73)	14.13 (±0.18)
		6	0.065 (±0.005)	923 (±70.77)	18.13 (±0.18)
		8	0.059 (±0.003)	785 (±27.74)	26.30 (±0.10)
		10	0.059 (±0.006)	703 (±83.33)	33.48 (±0.13)
	0.20	2	0.030 (±0.002)	493 (±34.41)	10.25 (±0.23)
		4	0.064 (±0.002)	982 (±28.15)	13.50 (±0.50)
		6	0.068 (±0.003)	869 (±142.59)	17.75 (±0.05)
		8	0.061 (±0.004)	811 (±62.37)	25.00 (±0.05)
10		0.066 (±0.012)	784 (±141.16)	31.75 (±0.07)	
MgCl <sub>2</sub>	0.05	2	0.025 (±0.001)	417 (±10.22)	12.53 (±0.02)
		4	0.068 (±0.001)	1041 (±20.09)	16.10 (±0.20)
		6	0.110 (±0.002)	1537 (±25.62)	20.95 (±0.45)
		8	0.122 (±0.001)	1616 (±3.09)	31.28 (±0.50)
		10	0.058 (±0.004)	685 (±40.86)	36.25 (±0.80)
	0.10	2	0.010 (±0.002)	160 (±31.76)	13.25 (±0.13)
		4	0.070 (±0.002)	1072 (±26.08)	18.65 (±0.18)
		6	0.109 (±0.006)	1529 (±67.12)	22.64 (±0.25)
		8	0.141 (±0.011)	1867 (±141.08)	33.45 (±0.25)
		10	0.115 (±0.004)	1353 (±40.03)	35.47 (±0.50)
	0.20	2	nd	nd	10.58 (±0.02)
		4	0.018 (±0.000)	281 (±3.42)	13.85 (±0.50)
		6	0.051 (±0.004)	721 (±59.47)	18.05 (±0.10)
		8	0.073 (±0.004)	974 (±57.30)	25.15 (±0.23)
10		0.072 (±0.015)	843 (±175.10)	32.00 (±0.40)	
KCl	0.05	2	0.056 (±0.002)	938 (±29.93)	10.88 (±0.08)
		4	0.076 (±0.003)	1157 (±48.56)	13.90 (±0.15)
		6	0.103 (±0.003)	1451 (±47.97)	18.10 (±0.40)
		8	0.095 (±0.005)	1251 (±57.71)	25.50 (±0.25)
		10	0.079 (±0.006)	917 (±53.87)	32.20 (±0.90)
	0.10	2	0.041 (±0.001)	681 (±14.96)	10.70 (±0.15)
		4	0.102 (±0.006)	1561 (±94.05)	14.30 (±0.05)
		6	0.128 (±0.001)	1799 (±5.66)	18.53 (±0.43)
		8	0.094 (±0.002)	1248 (±21.57)	26.83 (±0.43)
		10	0.075 (±0.001)	883 (±21.01)	34.15 (±0.65)
	0.20	2	0.023 (±0.002)	377 (±23.62)	12.83 (±0.13)
		4	0.067 (±0.002)	1029 (±27.40)	16.28 (±0.37)
		6	0.108 (±0.002)	1511 (±34.61)	21.33 (±0.13)
		8	0.144 (±0.003)	1901 (±42.07)	31.58 (±0.47)
10		0.152 (±0.003)	1787 (±43.49)	36.35 (±0.20)	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05	2	0.034 (±0.001)	574 (±8.40)	10.58 (±0.02)
		4	0.110 (±0.001)	1681 (±12.70)	13.85 (±0.20)
		6	0.149 (±0.019)	2088 (±280.62)	18.05 (±0.45)
		8	0.163 (±0.018)	2159 (±241.43)	25.15 (±0.50)
		10	0.122 (±0.012)	1451 (±143.48)	32.00 (±0.80)
	0.10	2	0.025 (±0.000)	420 (±1.37)	10.70 (±0.15)
		4	0.054 (±0.000)	824 (±4.28)	14.30 (±0.05)
		6	0.085 (±0.007)	1182 (±89.80)	18.53 (±0.43)
		8	0.115 (±0.004)	1518 (±63.21)	26.83 (±0.43)
		10	0.099 (±0.001)	1163 (±25.45)	34.15 (±0.65)
	0.20	2	0.021 (±0.000)	350 (±0.83)	11.98 (±0.23)
		4	0.041 (±0.003)	633 (±44.68)	16.00 (±0.50)
		6	0.089 (±0.016)	1245 (±226.95)	20.90 (±0.05)
		8	0.128 (±0.007)	1704 (±95.30)	30.65 (±0.05)
10		0.143 (±0.014)	1695 (±173.16)	35.23 (±0.07)	
Kontrol		2	0.026 (±0.002)	540 (±29.45)	10.40 (±0.30)
		4	0.061 (±0.004)	1040 (±7.24)	17.13 (±0.18)
		6	0.085 (±0.018)	1166 (±7.78)	22.20 (±0.25)
		8	0.051 (±0.016)	1042 (±72.48)	31.45 (±0.25)
		10	0.034 (±0.010)	744 (±51.65)	33.85 (±0.50)

nd: ölçüm limitlerinin (<0.001 U/ml) altındadır.



Çizelge EK-D.4. Farklı konsantrasyonlarda EDTA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> şartlarında enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle (g/l) değerleri.

Konsantrasyon	İnkübasyon (gün)	Enzim aktivitesi (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/g protein)	Biyokütle (g/l)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.1 µg/ml)	2	0.041 (±0.000)	678 (±2.44)	10.38 (±0.03)
	4	0.106 (±0.001)	1629 (±24.06)	13.15 (±0.50)
	6	0.130 (±0.002)	1833 (±28.76)	17.83 (±0.18)
	8	0.093 (±0.001)	1225 (±0.56)	26.45 (±0.18)
	10	0.065 (±0.006)	753 (±76.36)	32.75 (±0.05)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 µg/ml)	2	0.056 (±0.002)	931 (±33.21)	10.70 (±0.10)
	4	0.074 (±0.004)	1122 (±59.05)	13.95 (±0.10)
	6	0.114 (±0.001)	1599 (±4.72)	18.05 (±0.45)
	8	0.087 (±0.003)	1150 (±42.53)	25.15 (±0.50)
	10	0.057 (±0.001)	673 (±9.51)	32.00 (±0.80)
EDTA (0.04 g/l)	2	0.001 (±0.000)	16 (±5.14)	4.75 (±0.00)
	4	0.002 (±0.000)	28 (±1.31)	8.83 (±0.18)
	6	0.029 (±0.000)	415 (±3.23)	14.50 (±0.20)
	8	0.038 (±0.003)	501 (±21.47)	20.45 (±0.15)
	10	0.047 (±0.002)	551 (±22.00)	21.18 (±0.13)
EDTA (0.1 g/l)	2	nd	3 (±2.19)	6.63 (±0.18)
	4	nd	nd	9.13 (±0.28)
	6	0.034 (±0.000)	475 (±4.75)	14.83 (±0.13)
	8	0.049 (±0.007)	647 (±90.13)	20.70 (±0.10)
	10	0.059 (±0.007)	696 (±87.34)	22.15 (±0.15)
Kontrol	2	0.060 (±0.004)	996 (±66.99)	11.33 (±0.03)
	4	0.145 (±0.001)	2222 (±13.64)	14.45 (±0.20)
	6	0.135 (±0.002)	1894 (±29.23)	18.58 (±0.23)
	8	0.098 (±0.002)	1303 (±14.60)	27.08 (±0.08)
	10	0.072 (±0.004)	845 (±53.94)	34.78 (±0.28)

nd: ölçüm limitlerinin (<0.001 U/ml) altındadır.

Çizelge EK-D.5. Pepsin ve Tripsin enzim ilave edilmiş besiyerinde enzim aktivitesi (U/ml), spesifik aktivite (U/g protein) ve biyokütle (g/l) değerleri

Enzim	İnkübasyon (gün)	Enzim aktivitesi (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/g protein)	Biyokütle (g/l)
Tripsin (Başlangıç)	2	0.067 (±0.013)	1127 (±221.25)	10.83 (±0.08)
	4	0.137 (±0.011)	2105 (±171.72)	13.58 (±0.47)
	6	0.112 (±0.010)	1570 (±144.12)	18.08 (±0.53)
	8	0.056 (±0.005)	739 (±67.47)	26.30 (±0.20)
	10	0.038 (±0.008)	447 (±102.92)	31.97 (±0.29)
Tripsin (2. gün)	2	0.066 (±0.004)	1105 (±65.65)	10.25 (±0.09)
	4	0.188 (±0.002)	2882 (±39.51)	14.16 (±0.14)
	6	0.183 (±0.009)	2562 (±131.82)	18.80 (±0.27)
	8	0.141 (±0.021)	1875 (±277.24)	26.25 (±0.45)
	10	0.116 (±0.025)	1374 (±297.13)	32.18 (±0.19)
Pepsin (Başlangıç)	2	0.055 (±0.004)	912 (±57.85)	10.65 (±0.00)
	4	0.116 (±0.009)	1773 (±125.14)	13.33 (±0.33)
	6	0.094 (±0.004)	1320 (±66.42)	17.58 (±0.33)
	8	0.046 (±0.004)	617 (±56.09)	26.30 (±0.30)
	10	0.026 (±0.001)	301 (±14.36)	32.88 (±0.13)
Pepsin (2. gün)	2	0.063 (±0.002)	1047 (±36.07)	10.60 (±0.00)
	4	0.117 (±0.000)	1795 (±4.19)	13.98 (±0.08)
	6	0.111 (±0.009)	1558 (±129.85)	18.20 (±0.30)
	8	0.045 (±0.008)	598 (±112.17)	25.25 (±0.60)
	10	0.021 (±0.007)	250 (±78.50)	33.18 (±0.08)
Kontrol	2	0.060 (±0.004)	1001 (±73.74)	11.40 (±0.05)
	4	0.145 (±0.000)	2219 (±9.68)	14.78 (±0.23)
	6	0.122 (±0.001)	1720 (±0.77)	18.73 (±0.18)
	8	0.082 (±0.003)	1087 (±44.22)	27.43 (±0.23)
	10	0.050 (±0.006)	584 (±80.65)	35.05 (±0.30)

## EK-E

Çizelge EK-E.1. Farklı tuz doygunluk koşullarında çöktürme sonrası enzim aktivitesi (U/ml) değerleri

Tuz Konsantrasyonu (%)	Çöktürme Süresi (saat)	Aktivite (U/ml)			
		1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama	
GNB besiyeri		0.0097	0.0095	0.0096 (±0.0001)	
	1	0.0086	0.0083	0.0085 (±0.0002)	
	2	0.0075	0.0072	0.0074 (±0.0002)	
	3	0.0064	0.0067	0.0066 (±0.0002)	
	4	0.0068	0.0076	0.0072 (±0.0004)	
	6	0.0058	0.0062	0.0060 (±0.0002)	
90	1	0.0060	0.0060	0.0060 (±0.0000)	
	2	0.0086	0.0084	0.0085 (±0.0001)	
	3	0.0082	0.0087	0.0085 (±0.0002)	
	4	0.0086	0.0084	0.0085 (±0.0001)	
	6	0.0083	0.0089	0.0086 (±0.0003)	
	1	0.0052	0.0051	0.0052 (±0.0001)	
80	2	0.0051	0.0055	0.0053 (±0.0002)	
	3	0.0060	0.0054	0.0057 (±0.0003)	
	4	0.0055	0.0061	0.0058 (±0.0003)	
	6	0.0087	0.0078	0.0082 (±0.0004)	
	1	0.0007	0.0006	0.0006 (±0.0000)	
	70	2	0.0011	0.0009	0.0010 (±0.0001)
3		0.0006	0.0005	0.0006 (±0.0000)	
4		0.0005	0.0006	0.0006 (±0.0001)	
6		0.0012	0.0010	0.0011 (±0.0001)	
60		1	0.0007	0.0006	0.0006 (±0.0000)
		2	0.0011	0.0009	0.0010 (±0.0001)
	3	0.0006	0.0005	0.0006 (±0.0000)	
	4	0.0005	0.0006	0.0006 (±0.0001)	
	6	0.0012	0.0010	0.0011 (±0.0001)	

Çizelge EK-E.2. Farklı alkol konsantrasyonlarında çöktürme sonrası enzim aktivitesi (U/ml) değerleri

Alkol Konsantrasyonu (%)	Çöktürme Süresi (saat)	Aktivite (U/ml)		
		1. tekerrür	2. tekerrür	ortalama
GNB besiyeri		0.1661	0.1588	0.1625 (±0.0036)
	1	0.1383	0.1262	0.1322 (±0.0060)
	2	0.1511	0.1478	0.1494 (±0.0016)
	3	0.1364	0.1455	0.1410 (±0.0046)
	4	0.1585	0.1507	0.1546 (±0.0039)
	6	0.1569	0.1639	0.1604 (±0.0035)
80	1	0.0620	0.0601	0.0610 (±0.0009)
	2	0.1027	0.0965	0.0996 (±0.0031)
	3	0.1188	0.1151	0.1170 (±0.0018)
	4	0.1388	0.1290	0.1339 (±0.0049)
	6	0.1405	0.1267	0.1336 (±0.0069)
	1	0.0830	0.0673	0.0752 (±0.0079)
60	2	0.0942	0.0816	0.0879 (±0.0063)
	3	0.1221	0.1215	0.1218 (±0.0003)
	4	0.1160	0.1160	0.1160 (±0.0000)
	6	0.1255	0.1248	0.1252 (±0.0003)
	1	0.0968	0.0889	0.0929 (±0.0040)
	2	0.1110	0.1094	0.1102 (±0.0008)
50	3	0.1445	0.1424	0.1435 (±0.0010)
	4	0.1238	0.1094	0.1166 (±0.0072)
	6	0.1462	0.1335	0.1398 (±0.0064)

## EK-F

Çizelge EK-F.1. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim stabilitesine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Süre (dak)	Aktivite (U/ml)	Kalan aktivite (%)
40	0	0.191 (±0.001)	100.0 (±0.45)
	300	0.159 (±0.002)	83.25 (±0.86)
	600	0.113 (±0.001)	59.01 (±0.36)
	900	0.077 (±0.004)	40.33 (±1.99)
	1200	0.041 (±0.004)	21.55 (±2.26)
	1500	0.016 (±0.002)	8.37 (±0.90)
45	0	0.195 (±0.000)	100.0 (±0.09)
	120	0.133 (±0.000)	68.06 (±0.13)
	240	0.089 (±0.001)	45.30 (±0.62)
	340	0.066 (±0.001)	33.95 (±0.75)
	480	0.035 (±0.002)	17.96 (±0.93)
	600	0.015 (±0.001)	7.93 (±0.53)
50	0	0.203 (±0.000)	100.0 (±0.13)
	25	0.151 (±0.001)	74.32 (±0.51)
	50	0.103 (±0.001)	50.99 (±0.34)
	75	0.089 (±0.001)	43.75 (±0.68)
	100	0.039 (±0.006)	19.31 (±2.81)
	125	0.023 (±0.001)	11.13 (±0.43)
55	0	0.203 (±0.000)	100.0 (±0.13)
	15	0.092 (±0.001)	45.37 (±0.51)
	25	0.055 (±0.001)	27.14 (±0.26)
	35	0.033 (±0.000)	16.45 (±0.21)
	45	0.029 (±0.001)	14.37 (±0.26)
	55	0.015 (±0.001)	7.38 (±0.51)
60	0	0.203 (±0.000)	100.0 (±0.13)
	5	0.105 (±0.001)	52.01 (±0.43)
	10	0.093 (±0.002)	46.09 (±0.89)
	15	0.053 (±0.003)	26.25 (±1.41)
	20	0.034 (±0.001)	16.88 (±0.64)
	25	0.015 (±0.001)	7.38 (±0.60)

Çizelge EK-F.2. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim stabilitesine pH'nın etkisi

pH	Süre (dak)	Aktivite (U/ml)	Kalan aktivite (%)
4.0	0	0.19 (±0.001)	100.0 (±0.32)
	5	0.10 (±0.002)	52.98 (±1.05)
	10	0.05 (±0.002)	28.37 (±1.19)
	15	0.04 (±0.000)	19.74 (±0.23)
	20	0.03 (±0.000)	16.91 (±0.05)
	30	0.02 (±0.001)	11.93 (±0.46)
	6.0	0	0.19 (±0.000)
10		0.19 (±0.006)	98.22 (±3.20)
20		0.18 (±0.001)	96.44 (±0.78)
30		0.19 (±0.004)	100.5 (±2.37)
60		0.19 (±0.002)	103.0 (±1.14)
8.0	0	0.19 (±0.000)	100.0 (±0.14)
	10	0.09 (±0.000)	45.81 (±0.09)
	20	0.08 (±0.000)	44.85 (±0.05)
	30	0.08 (±0.001)	43.66 (±0.68)
	45	0.09 (±0.002)	48.50 (±0.96)
	60	0.09 (±0.002)	49.78 (±1.14)

Çizelge EK-F.3. Kısmi saflaştırılmış mTG enzim aktivitesine metal iyonları ve EDTA'nın etkisi

Uygulama	Aktivite (U/ml)	Kalan aktivite (%)
Kontrol	0.185 (±0.001)	100.00 (±0.28)
EDTA	0.227 (±0.002)	122.35 (±0.84)
ZnSO <sub>4</sub>	0.009 (±0.000)	4.82 (±0.19)
FeCl <sub>3</sub>	0.128 (±0.000)	69.17 (±0.19)
CaCl <sub>2</sub>	0.179 (±0.006)	96.74 (±2.98)
Cl <sub>2</sub> Co	0.132 (±0.000)	71.17 (±0.05)

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Çorlu'da doğmuştur. 2015 yılında lisans eğitimini Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde tamamlamıştır. 2015 Eylül ayı içinde Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Teknolojisi Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamış ve Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: 2016/59)'nde görev almıştır.

