ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDEMİK MİKROBİYAL KAYNAKLI EKSTRASELÜLER PROTEAZ ENZİM ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

Emre GÜNGÖR

SÜT TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENDEMİK MİKROBİYAL KAYNAKLI EKSTRASELÜLER PROTEAZ ENZİM ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

Emre GÜNGÖR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Süt Teknolojisi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şebnem BUDAK
Eş danışman: Prof. Dr. Sencer BUZRUL

Bu çalışmada, dört farklı *Penicillium* cinsi küf türünün hücre dışı proteaz enzim üretimlerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda değerlendirilen küfler *P. brevicompactum, P. chrysogenum, P. cavernicola, ve P. corylophilum* türlerinden oluşmaktadır. Çalışma öncesinde coğrafi işarete sahip geleneksel bir peynir olan Divle Obruğu Tulumundan izole edilen stok kültürler kullanılmıştır. Suşlar, malt extract agar besiyerinde 28 °C'de 5 gün aerobik olarak canlandırılmış olup gelişen suşlar peynir besiyerine inkübe edilerek elde edilen süpernatant enzim aktivitesi tayininde kullanılmıştır. Peynir besi ortamını içeren petri kaplarında gelişen küf tabakası altında kalan sıvı kısım süpernatant olarak kullanılmıştır. Küflerin enzim aktiviteleri belirlenirken 3 farklı parametre kullanılmış olup, bunlar pH, sıcaklık ve süre'dir. Her parametre için üç farklı değer değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Değerler pH 4.7, 5.0 ve 5.3; sıcaklık 15, 20 ve 25 °C; süre 7, 11 ve 14 gün olarak belirlenmiştir. UV-VIS spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri ile enzim aktivite sonuçları elde edilmiştir. Suşların optimum enzim üretim koşullarını belirlemek için farklı modeller denenmiş ve ikinci dereceden polinom modelin uygun olduğu değerlendirilmiştir. Modelleme sonuçlarımıza göre *P. corylophilum* hariç sıcaklığın enzim aktivitesi üzerinde anlamlı bir etkisi bulunamamıştır. *P. corylophilum* için en yüksek enzim aktivitesi 15 °C'de 5.03 pH ve 12.1 günde, 20 °C'de 5.03 pH ve 11.3 günde ve 25 °C'de 5.03 pH ve 10.6 günde şeklinde bulunmuştur.

Elde edilen bu veriler tezin tamamlanması sonrasında uzun vadede gerçekleştirilecek diğer çalışmalar ile ekstrakte enzimin mikrobiyal enzim kaynağı olarak peynir üretiminde kullanılan rennet enzimine alternatif olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesinde yardımcı olacaktır.

Şubat 2024, 88 sayfa

Anahtar Kelimeler: proteaz, enzim aktivitesi, matematiksel modelleme, *Penicillium brevicompactum, Penicillium chrysogenum, Penicillium cavernicola, Penicillium corylophilum*

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

OPTIMIZATION OF EXTRACELLULAR PROTEASE ENZYME PRODUCTION OF ENDEMIC MICROORGANISMS

Emre GÜNGÖR

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Dairy Technology

Supervisor: Prof. Dr. Şebnem BUDAK
Co-supervisor: Prof. Dr. Sencer BUZRUL

In this study, the aim was to evaluate the extracellular protease enzyme production of four different species of the *Penicillium* genus. The evaluated molds included *P. brevicompactum, P. chrysogenum, P. cavernicola, and P. corylophilum*. Prior to the study, stock cultures isolated from Divle Obruğu Tulum cheese, a traditional cheese with geographical indication, were used. Strains were revived aerobically at 28 °C for 5 days on malt extract agar medium, and the resulting strains were incubated in cheese medium to determine the supernatant enzyme activity. The liquid portion beneath the mold layer developed in petri dishes containing cheese medium was used as the supernatant. Three different parameters were used to determine the enzyme activities of molds: pH, temperature and duration. Three different values were considered for each parameter. The values were determined as follows: pH 4.7, 5.0, and 5.3; temperature 15, 20, and 25 °C; duration 7, 11, and 14 days. Enzym activity results were obtained with absorbance values measured at 660 nm wavelength on a UV-VIS spectrophotometer. Different models were tried to determine the optimum enzyme production of strains, and the second-degree polynomial model was considered suitable. According to the modeling results, except for *P. corylophilum*, temperature did not have a significant effect on enzyme activity. The highest enzyme activity for *P. corylophilum* was found at 15 °C with pH 5.03 and 12.1 days, at 20 °C with pH 5.03 and 11.3 days, and at 25 °C with pH 5.03 and 10.6 days.

These data obtained will help determine the usability of the extracted enzyme as a microbial enzyme source as an alternative to the rennet enzyme used in cheese production, with other studies to be carried out in the long term after the completion of the thesis.

February 2024, 88 pages

Key Words: protease, enzym activity, mathematical modelling, *Penicillium brevicompactum, Penicillium chrysogenum, Penicillium cavernicola, Penicillium corylophilum*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başlangıcından tamamlanmasına kadar geçen süreçte, tez konusu seçimi, laboratuvar çalışmaları ve her türlü konuda bana yardımcı olan, değerli zamanını ayıran, desteklerini esirgemeyen Danışman hocam Prof. Dr. Şebnem Budak'a ve Eş Danışman hocam Prof. Dr. Sencer Buzrul'a (Necmettin Erbakan Üniversitesi Gıda mühendisliği Anabilim Dalı), Süt Teknolojisi Anabilim Dalı değerleri hocalarıma ve tez çalışmam süresince destekleri için değerli mesai arkadaşım Oğuzhan GÜLTEKİN'e,

Tüm bu süreçte desteklerini sürekli hissettiren kıymetli eşim Çağrı GÜNGÖR ve kızım Serra GÜNGÖR ile tüm aileme teşekkür ederim. Bu çalışmayı Babam Atila GÜNGÖR'ün anısına ithaf ediyorum.

Emre GÜNGÖR
Ankara, Şubat 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ **5**
2.1 Enzimler **5**
2.2 Enzimlerin Tarihçesi **5**
2.3 Enzimlerin Yapısı **6**
2.4 Enzimlerin Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler **7**
2.5 Enzimlerin Sınıflandırılması **8**
2.6 Mikrobiyal Enzimler **10**
2.7 Proteazlar **11**
2.8 Proteazların Sınıflandırılması **12**
2.8.1 Ekzopeptidazlar **13**
2.8.2 Endopeptidazlar **14**
2.9 Proteaz Enzim Kaynakları **15**
2.9.1 Bitkisel proteazlar **16**
2.9.2 Hayvansal proteazlar **16**
2.9.3 Mikrobiyal proteazlar **17**
2.9.3.1 Bakteriyel proteazlar **18**
2.9.3.2 Fungal proteazlar **18**
2.9.3.3 Viral proteazlar **22**
2.10 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) **22**
2.11 Proteazların Kullanım Alanları **23**
2.11.1 Gıda endüstrisi **23**
2.11.2 Deterjan endüstrisi **24**
2.11.3 Tekstil endüstrisi **25**
2.11.4 Deri endüstrisi **25**
2.11.5 Kağıt ve fotoğraf endüstrisi **26**
2.11.6 İlaç ve kozmetik endüstrisi **26**
2.11.7 Atık endüstrisi **27**
2.12 Türkiye'de Üretilen Küflü Peynirler **27**
2.13 Divle Obruğu Tulum Peyniri **28**
2.14 Matematiksel Modelleme **30**
2.15 Proteaz Aktiviteleri ile Yapılan Daha Önceki Çalışmalar **32**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **38**
3.1 Materyal **38**
3.1.1 Çiğ süt **38**
3.1.2 Peynir mayası (Rennet) **38**
3.1.3 Küfler **38**

3.1.4 Besiyerleri 38
3.1.5 Kimyasallar ve çözeltiler 39
3.2 Yöntem 41
3.2.1 Peynir üretimi 41
3.2.2 Stok kültürleri aktivasyonu 43
3.2.3 Hemositometre yöntemi ile küf sayımı 43
3.2.4 Peynir besi ortamı hazırlığı 44
3.2.5 Küflerin inokülasyonu 45
3.2.6 Süpernatant eldesi 46
3.2.7 Tirozin standart eğrisi grafiği 47
3.2.8 Proteaz enzim aktivitesi belirlenmesi 49
3.2.9 Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) analizi 50
3.2.10 Modelleme 51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 53
4.1 Suşların Proteaz Enzim Aktiviteleri 53
4.1.1 Peynir besi ortamı 53
4.1.2 *Penicillium brevicompactum* 54
4.1.3 *Penicillium cavernicola* 55
4.1.4 *Penicillium chrysogenum* 57
4.1.5 *Penicillium corylophilum* 58
4.2 Süpernatantların SDS-PAGE Protein Profilleri 60
4.3 Proteaz Enzim Üretimleri Matematiksel Modelleri 62
5. SONUÇLAR 71
KAYNAKLAR 76
ÖZGEÇMİŞ 88

SİMGELER DİZİNİ

Tris	Trihidroksimetilaminometan
HCI	Hidroklorik Asit
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit

Kısaltmalar

APS	Amonyum Persülfat
MEA	Malt Ekstrakt Agar
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromotografisi
UV	Ultraviyole
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
TCA	Trikloroasetik asit
N	Normal
UV-VIS	Mor ötesi görünür bölge
TEMED	Tetra Etil Metilen Diamin
pH	Hidrojen Potansiyeli
µL	Mikrolitre
°C	Santigrad Derece
P.	*Penicillium*
L	Litre
mL	Mililitre
g	Gram
kDa	Kilodalton
dk	Dakika
mM	Milimolar
rpm	Dakikadaki devir sayısı
nm	Nanometre
mg	Miligram
µM	Mikromol
dk	Dakika

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Proteazların peptid bağını hidrolize etme mekanizması 11

Şekil 2.2 Divle Obruğu Tulum Peyniri üretim akışı 29

Şekil 3.1 Taze Divle Obruğu Tulumu üretim akış şeması 42

Şekil 3.2 Stok kültürleri canlandırma..... 43

Şekil 3.3 İnkübasyon sonrası petrilerde oluşan sıvı kısım 46

Şekil 3.4 Santrifüjleme sonrası süpernatant görüntüleri 46

Şekil 3.5 Tirozin standart eğrisi 48

Şekil 3.6 Örneklerde gözlenen renk değişimi 49

Şekil 4.1 SDS-PAGE protein profilleri..... 61

Şekil 4.2 *P. brevicompactum* suşu için Çizelge 4.11'de yer alan parametre değerleri kullanılarak 15, 20 ve 25 °C sıcaklıkta elde edilen üç boyutlu yüzeyler 67

Şekil 4.3 *P. cavernicola* suşu için Çizelge 4.11'de yer alan parametre değerleri kullanılarak 15, 20 ve 25 °C sıcaklıkta elde edilen üç boyutlu yüzeyler 68

Şekil 4.4 *P. chrysogenum* suşu için Çizelge 4.11'de yer alan parametre değerleri kullanılarak 15, 20 ve 25 °C sıcaklıkta elde edilen üç boyutlu yüzeyler 69

Şekil 4.5 *P. corylophilum* suşu için Çizelge 4.11'de yer alan parametre değerleri kullanılarak 15, 20 ve 25 °C sıcaklıkta elde edilen üç boyutlu yüzeyler 70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Enzimlerin karşılaştırılması 8

Çizelge 2.2 Proteazların Sınıflandırılması 13

Çizelge 2.3 Proteaz Kaynakları 15

Çizelge 2.4 Modeli oluşturan değişkenler 30

Çizelge 3.1 Küf suşlarının pH, T ve t parametreleri kombinasyonu 45

Çizelge 3.2 Tirozin ana stok çözeltisi seyreltme 48

Çizelge 4.1 Peynir proteaz enzimi aktiviteleri (n=2)* 53

Çizelge 4.2 *Penicillium brevicompactum* proteaz aktiviteleri (n=2)* 54

Çizelge 4.3 *Penicillium cavernicola* proteaz aktiviteleri (n=2)* 56

Çizelge 4.4 *Penicillium chrysogenum* proteaz aktiveleri (n=2)* 57

Çizelge 4.5 *Penicillium corylophilum* proteaz aktiviteleri (n=2)* 58

Çizelge 4.6 Denklem (1)'in verilere uygulanması sonucu elde edilen parametreler ± parametrelerin standart hataları ve model uyum göstergeleri 62

Çizelge 4.7 Denklem (2)'nin verilere uygulanması sonucu elde edilen parametreler ± parametrelerin standart hataları ve model uyum göstergeleri 63

Çizelge 4.8 Denklem (3)'ün verilere uygulanması sonucu elde edilen parametreler ± parametrelerin standart hataları ve model uyum göstergeleri 63

Çizelge 4.9 Denklem (4)'ün verilere uygulanması sonucu elde edilen parametreler ± parametrelerin standart hataları ve model uyum göstergeleri 65

Çizelge 4.10 Denklem (4)'ün geriye doğru regresyon yapılarak verilere uygulanması sonucu elde edilen parametreler ± parametrelerin standart hataları ve model uyum göstergeleri 66

1. GİRİŞ

Enzimler, organizmalar tarafından sentezlenen protein yapısında olan biyomoleküllerden biridir. Genellikle tüm canlıların hücrelerinde meydana gelen kimyasal reaksiyonlar enzim sayesinde oluşmaktadır. Enzimler kontrol altında sentezlenmekte olup, organik katalizörlerdir (Sargın ve Öngen 2003). Katalitik bölümleri hidrofobik ceplerinin içinde yer almaktadır. Substratlara spesifik olması katalitik bölgeleri sayesinde oluşmaktadır. (Singh vd. 2016).

Enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük yaşamımızda yer almaktadırlar. Genellikle mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin hücrelerde çok önemli metabolik fonksiyonları bulunmaktadır. Çok miktarlarda elde edilebilmeleri, yüksek katalitik aktiviteye sahip olmaları ve hayvansal enzimlerden daha kararlı, ucuz olması nedeniyle mikroorganizma kaynaklı enzimler endüstride daha çok tercih edilmektedirler. Ayrıca mikroorganizmaların biyokimyasal çeşitliliği, genetik modifikasyona uygun olması da bu anlamda büyük yarar sağlamaktadır. Bu yüzden sanayide kullanılan enzimlerin %90'ı mikroorganizma kökenlidir (Uçar 2011; Özcan 2015).

Eski çağlarda enzimler sirke, şarap, bira, peynir, keten ve deri gibi ürünlerin üretiminde kullanılmıştır. Fakat son yüzyılda enzimatik biyoteknolojideki gelişmeler, fermentasyon yöntemlerinin yaygınlaşması sonucu enzim endüstrisi gelişmiş ve uygun suşlar kullanılarak saf enzim üretimi başlamıştır. Günümüzde de enzim üretimi hızla artarak devam etmektedir. Hali hazırda 2500'den fazla enzimin hemen hemen %10'u farklı endüstriyel alanlarda ticari anlamda kullanılmaktadır. Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin %44'ü gıda ve yem sanayinde olmak üzere; ecza, tekstil ve alkol endüstrisinde ticari olarak kullanılmaktadır (Haliskaranfil 2012; Hammamchi 2014; Özcan 2015).

Proteazlar, proteinlerin ve peptit bağlarının hidrolizini gerçekleştiren enzimlerdir. Proteoliz işleminin ürünleri serbest amino asitler, protein ve peptit fragmentleridir. (Pollah 1989; Salleh vd. 2006). Proteazlar, süt ve ürünleri endüstrisinde ilk olarak peynir mayası olarak kullanılmıştır (Gaur vd. 2015). Günümüzde de en çok peynir üretiminde kullanılmaktadır. Proteazlar peynir yapımında sütteki proteinlerin spesifik peptit

bağlarını hidrolize ederek para-κ-kazein makro peptitlerinin oluşmasını sağlayarak sütün pıhtılaşmasını ve peynir oluşumunu gerçekleştirmektedirler (Souza vd. 2022).

Proteazlar, dört sınıfa ayrılmış olup bunlar; serin, sistin, asidik proteazlar ve metallo proteazlardır. Her grup, aktif bölgeyi tanımlamak için belirli bir yapılanışta olup karakteristik amino asit kalıntısına sahiptir. Serin proteazlar aktif kısımlarında serin ünitesine sahip enzimlerdir ve pH 7.0 ile 11.0 arasındaki nötral ve alkalin değerlerinde etkinlik gösterirler. Aspartik proteazlar, aspartik asit kalıntılarına sahip olan endopeptidazlar olarak bilinir ve katalitik aktivite gösterirler. Sistein proteazlar, katalitik aktiviteleri histidin ve sistein kalıntıları olan endopeptidazlardır. Sistein proteazları, indirgeyici ajanların varlığında aktif hale gelirler. Diğer bir grup olan metallo proteazlar ise aktiviteleri için çinkoya gereksinim duyar ancak bazen manganez, bakır, nikel ve kabolt gibi iyonlar da gerekebilir. Bu proteazlar EDTA gibi şelatlayıcı ajanlarla inhibe edilebilirler. Proteazlar, proteinleri oluşturan amino asit bağlarını hedef alarak onları parçalayan enzimlerdir. Bu enzimler, kesme kabiliyetlerine göre iki ana gruba ayrılmışlardır: ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar. (Rao vd. 1998; Yegin vd. 2011; Souza vd. 2015). Aspartik proteaz, endopeptidaz grubundadır ve peynir teknolojisinde süt pıhtılaştırma etkisi nedeniyle en önemli proteaz grubudur (Claverie-Martin ve Vega-Hernàndez 2007). Sütü pıhtılaştıran enzimlerin hepsi asit proteaz olup en yaygın kullanılan süt pıhtılaştırma enzimi olan rennet asit proteazdır. Aspartik proteazlar yaklaşık pH 3.0-5.0 arasında maksimum aktivite gösterirler (Sumantha vd. 2006; Koçak 2015). Hayvanların şirdeninden elde edilen rennet, kimozin ve pepsinden oluşmaktadır. Kimozin, kimozin A ve kimozin B izoenzimlerinden oluşmaktadır. Optimum pH'ları 4.2 ve 3.7'dir ve 41 °C optimum sıcaklık değeridir. Pepsin ise pH 2'de optimumdur. Pepsinin olgunlaşma aşamasını uzatması ve proteolitik aktivitesinin yüksek olması sebebiyle acı tat oluşumuna sebep olmaktadır. Bu nedende uygulamada tek başına pepsin kullanılmamaktadır, kimozin ve pepsin enzimleri karıştırılarak kullanılmaktadır (Çakmakçı vd. 2017).

Proteazlar, geniş bir biyolojik çeşitliliğe sahip farklı organizmalardan elde edilen önemli enzimlerdir. Bu kaynaklar arasında bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bitkisel ve hayvansal proteazların ihtiyacı yeterince karşılayamaması

sonucunda mikroorganizma kaynaklı proteazlar kullanılmaya başlanmıştır. *Penicillium, Mucor, Rhizopus, Bacillus* cinslerine ait mikroorganizmalar yüksek proteaz enzimi üretim kapasitelerinden dolayı mikrobiyal enzim kaynağı olarak kullanılabilmektedirler (Singh vd. 2016).

Matematiksel model, çalışılan sistemdeki ilgili değişkenler arasındaki ilişkiler olarak tanımlanabilir. Bu ilişkiler modeli denklemler, tablolar, grafikler olabilir. Çalışılan sistem hücre, mikrobiyal kültür, immobilize hücre, enzim veya santrifüj, sistemi olabilirken, prametreler ise sıcaklık, pH, süre, inokulum miktarı vb. olabilir. Matematiksel modelleme sistemi, sıcaklığı azaltıp süreyi arttırırsak, glikoz konsantrasyonunu azaltırsak, inokulumdaki spor sayılarını azaltırsak ya da farklı parametrelerde çeşitli değişiklikler yaparsak ne olur gibi soruları cevaplandırmak için kullanılabilen bir sistemdir (Mavituna ve Sinclair 2008).

Bu çalışmada, doğal peynir izolatı olan *P. brevicompactum, P. chrysogenum, P. cavernicola, P. corylophilum* küf suşlarının proteaz enzim üretim kapasiteleri belirlenmiştir. Belirlenen proteaz enzim üretim kapasiteleriyle potansiyeli yüksek olan suşların süt endüstrisinde saf proteaz enzim üreticisi olarak kullanımının yaygınlaştırılması hedeflenmiştir. Bu suşlar geleneksel ve küfle olgunlaşan bir peynir olan Divle Obruğu Tulum Peyniri olgunlaşma aşamasında doğal olarak gelişen ve izole edilerek tanımlanan (Ozturkoglu-Budak vd. 2016a) küf suşlarıdır. Benzer şekilde bu suşların peynir ortamında ürettikleri proteaz enzim miktarları da kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiş ve elde edilen veriler ile peynir olgunlaşmasına katkıları da değerlendirilmiştir (Ozturkoglu-Budak vd. 2016b). Değerlendirmeye tabi tutulan küf suşları üretim sonrası henüz olgunlaşmaya tabi tutulmayan taze Divle Obruğu Tulum Peynirinin bazal besiyeri olarak kullanıldığı ve bu peynire ait pH, tuz konsantrasyonu gibi üretim ve sıcaklık, oksijen varlığı gibi olgunlaşma koşullarının aynen uyarlandığı *in-vitro* ortamda en fazla proteaz enzim aktivitesi gösteren suşlar olarak seçilmiştir.

Ancak Divle Obruğu Tulum Peynirine ait üretim ve olgunlaşma koşulları gerek peynirin uzun bir olgunlaşma süresine sahip olması gerekse bu olgunlaşmanın mağara gibi kontrolsüz bir ortamda gerçekleşmesi nedenleri ile aslında ilgili parametreler bakımından

oldukça geniş bir aralıkta değişen değerler gösterdiği gözlenmiştir (Ozturkoglu-Budak 2016b). Bu tez çalışmasında ise her bir suşa ait optimum enzim üretim koşullarının belirlenmesi kapsamında, sıcaklık, pH ve süre gibi parametrelerin gerçek peynir üretiminde gözlenen geniş aralık içerisinde yer alan farklı değerlerinin *in-vitro* ortamda sabit olarak kullanılması ile değişen gelişim koşulları kullanılmış ve bu farklı koşullarda küfler tarafından sentezlenen proteaz enzim miktarının nasıl değiştiği ve optimum koşulların hangi değerleri içerdiğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, elde edilen deneysel veriler matematiksel modelleme işlemine tabi tutulmuştur. Modelleme ile suşların proteaz enzim üretimi için optimum değerleri görsel, üç boyutlu olarak görülmüştür ve her bir suşa ait süreçteki bağımsız değişkenlerin birlikte proteaz enzim aktivitesine etkileri değerlendirilmiştir (Wahab 2023).

Bu kapsamda ileri proteaz enzim aktivitesine sahip olan 4 *Penicillium* küf türü tarafından sentezlenen ekstraselüler proteaz enzimlerin uzun vadede yapısal ve işlevsel değerlendirmesi yapılarak peynir endüstrisinde kullanılan hayvansal rennet enzimine alternatif mikrobiyal bir proteaz enzimi olarak kullanılabilirliği değerlendirilecektir. Bu şekilde ülkemizde peynir endüstrisinde ülkemize özgü (endemik) kültür kaynaklı yerli enzimler kullanımının değerlendirilmesi ve başarılı sonuçlar elde edilmesi durumunda dışa bağımlılığın azaltılması amaçlanmaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Enzimler

Canlı organizmalar tarafından sentezlenen protein yapısında ve peptit bağlarıyla bağlanmış uzun aminoasit zincirlerinden oluşan biyolojik moleküllere enzim denir. Hayatımızın her noktasında yer alan enzimler canlıların (hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar) hücrelerinde oluşan kimyasal reaksiyonların çoğundan sorumludur. Kimyasal reaksiyonda etkili olan enzimler ayrıca reaksiyonu hızlandırarak biyolojik katalizör olarak görev yapar (Sargın ve Öngen 2003).

Reaksiyon sırasında enzim ve substrat arasında anahtar-kilit modeli denen bir sistem oluşmaktadır. Bu reaksiyon esnasında enzim-substrat (ES) kompleksini meydana getirirler. Bu kompleks yeni bir ürün oluşturmak ve enzimi geri kazanmak için enzim-ürün (ER) kompleksi oluştur ve kimyasal değişime uğrar. Genel olarak iyon-iyon, iyon-dipol ve hidrojen bağları gibi kovalent bağ olmayan etkileşimler enzim-substrat arasındaki etkileşimlerdir. Ancak bazen aralarında kovalent bağ oluşan durumlar da olmaktadır. Hangi bağ olursa olsun bu bağlar enzim ve ürünü açığa çıkaracak derecede zayıf olması gerekir (Yenigün 2000).

Metabolik reaksiyonlar, hücredeki hayati olayların temelini oluşturan süreçlerdir. Bu olaylar, organik maddelerin hücre içinde üretilmesi, parçalanması, sindirilmesi, kasılması ve hücre solunumu gibi önemli fonksiyonları içerir (Özden 2014).

2.2 Enzimlerin Tarihçesi

Homeros'un İlyada destanında M.Ö. 400 yıllarında enzimlerin fermentasyon sürecinde kullanımından bahsetmektedir (İnamuddin vd. 2019). 1850'lerde Lous Pasteur şekerin maya aracılığıyla alkole, fermentasyonun ise daha sonra enzimler olarak adlandırılacak olan fermentler ile katalizlendiğini kanıtlamış oldu (Kıran vd. 2006). Enzimler terim olarak 1878 yılında Fizyoloji Profesörü Wilhelm Friedrich Kühne tarafından

kullanılmıştır (İnamuddin vd. 2019). Eduard Buchner ise 1897 yılında maya ekstraktlarının şekeri alkole fermente edebildiğini bularak enzimlerin hücre dışında da çalışabildiğini ispatladı. Tüm bu gelişmelerden sonra James Sumner 1926 yılında üreazı izole etmiştir. Ardından üreazı kristalize etmiştir. Bu çalışmasına dayanarak üreaz kristallerinin tamamının proteinden meydana geldiğini ve enzimlerin aslında protein olduklarının iddiasında bulunmuştur ancak benzer çalışmalar olmadığından bu düşünce belli süre askıda kalmıştır. Bu çalışmadan kısa süre sonra 1930 yılında John Northrop ve meslektaşları tripsini, pepsini kristalize etmiştir, bunların protein olduğunu bulmuştur. James Sumner'ın elde ettiği sonuç bu şekilde kabul görmüştür. 1930'larda tanımlanan enzim sayısı 80 adettir ve günümüzde çok fazla enzim çeşidi bulunmuş olup çalışmalar devam etmektedir (Kıran vd. 2006).

2.3 Enzimlerin Yapısı

Tüm enzimler, katalitik RNA moleküllerinin bir istisnası dışında, yapısal olarak proteinlere aittir. Bu nedenle, enzimlerin genel özellikleri büyük ölçüde protein yapısının karakteristik özelliklerini yansıtır. Kollodial ve protein yapısında olma özelliklerinden ötürü fiziksel, kimyasal faktörlerden etkilenirler. Enzim proteinlerinin doğal konformasyon yapıları primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapıları içerir ve bu yapılar enzimlerin katalitik aktivitelerini yansıtarak işlevlerini yerine getirir. Enzimin yapısı bozulmasıyla denatüre olursa katalitik aktivitesi genelde biter. Enzim aminoasitlerine parçalandığında ise katalitik aktivitesi çok büyük zarar görür (Özden 2014).

Enzimlerin çoğu, katalitik işlevlerini yerine getirirken sadece protein yapısına değil, aynı zamanda protein olmayan bir kofaktöre veya prostatik gruba da sahiptir. Prostatik grup enzime belirli özellikler kazandıran aminoasit olmayan proteine bağlı gruptur. Kataliz için gereken organik moleküllere kofaktör adı verilmektedir. Koenzim ise genelde bir vitaminden türeyen ve enzim aktivitesi için gerekli olan organik moleküller olarak tanımlanır. Koenzimlerden bazıları protein kısmına sıkı bağlı olduğundan proteinden uzaklaştırılmaya çalışıldığında protein yapısına bozmaktadır. Aksine bazen de proteine çok gevşek bağlıdır. Bu yüzden basit bir diyalizle bile proteinden ayrılır.

Enzimin işlevi için gereken tüm yardımcı faktörleri içeren formuna haloenzim adı verilir. Kofaktörleri olmayan ya da kaybetmiş sadece protein kısmı apoenzim olarak isimlendirilmektedir. Apoenzimler büyük protein moleküllerinden oluşmaktadır ve her enzimde amino asit çeşitleri ve dizilimlerinden dolayı farklılık göstermesinden enzimlerin spesifik kısmıdır. Apoenzimin protein yapısında olması enzimlerin makromolekül olmasının sebebidir (Stryer 1981).

2.4 Enzimlerin Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler

Enzimlerin gerçekleştirdiği reaksiyonlar birçok faktörden etkilenebilmektedirler. Bu faktörler sıcaklık, pH, süre, su, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, substrat yüzeyi, inhibitörler ve aktivatörlerdir.

Sıcaklık: Her enzim reaksiyonunun gerçekleştiği optimum bir sıcaklık bulunmaktadır. 0 °C'de enzimler aktif değillerdir. Sıcaklığın her 10 °C artmasıyla reaksiyon üç kata kadar artmaktadır.

pH: Enzimlerin kendilerine özgü pH değerleri bulunmaktadır. Bu değer her enzim için optimum olarak adlandırılmaktadır. Bu değer haricindeki değerlerde reaksiyon hızı azalmaktadır. Enzimin optimum pH'sı substrat yapısı, tamponun cinsi, enzim kaynağı gibi faktörlerden etkilenmektedir.

Zaman: Zaman geçtikçe reaksiyon hızı giderek düşmektedir.

Su: Moleküllerin birbirine çarparak reaksiyonu gerçekleştirebilmesi için ortamda su olması gereklidir. Ortamda su olması moleküllerin hareketini sağlamaktadır.

Enzim Konsantrasyonu: Enzim reaksiyon hızı enzim konsantrasyonu arttıkça artmaktadır. Fakat bu artış substrat miktarına bağlı olarak lineer bir artış gösterir. Substrat miktarı sınırlı ise reaksiyon hızı giderek düşer.

Substrat Konsantrasyonu: Enzimler ve substratlar arasında doğrusal bir ilişki vardır; yani, ne kadar çok enzim molekülü bulunursa, reaksiyon hızı o kadar artar.

Substrat Yüzeyi: Yüzey miktarı arttıkça reaksiyon hızı artmaktadır.

İnhibitörler ve Aktivatörler: Enzimlerin çalışmasını etkisiz hale getiren maddelere inhibitör, reaksiyon hızını arttıran çalışmalarını hızlandıran maddelere ise aktivatör adı verilmektedir. İnhibitörlerden bazıları Ca^{+2}, Na^{+} gibi iyonlar aktivatörlerden bazılarına ise su, Mg^{+2}, K^{+} iyonları örnek gösterilebilir (Uyanık 2008).

2.5 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler en basit haliyle iki sınıfta incelenirler. Bunlar endo enzimler (hücre içi enzimler) ve ekzoenzimler (hücre dışı enzimler) olarak sıralanabilirler. Endo enzimler hücre metabolizması için gerekli olan gıda absorbsiyon ve tranformasyonunda rol oynarlar. Bu sırada enerji ortaya çıkar. Hücre dışı enzimler ise hücrenin ürettiği ve hücre duvarının etrafından dışarı salgıladığı enzimlerdir. Hücreden bağımsız olarak ortamdaki karbonhidrat, yağ, proteinleri parçalarlar. Bu iki grup enzimin genel özellikleri Çizelge 2.1' de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir (Topal 1985).

Çizelge 2.1 Enzimlerin karşılaştırılması (Topal 1985)

Hücre İçi Enzimler	**Hücre Dışı Enzimler**
Hücre içinde rol oynarlar	Hücre dışında rol oynarlar
Oksidasyon, redüksiyon potansiyelini ayarlar.	Hidrolitik anlamda görevlidirler
Büyük enerji açığa çıkarırlar	Az enerji açığa çıkar
Enerji hücrede kullanılabilir	Enerji hücrede kullanılamaz, formu uygun değildir

1940'lı yıllardan sonra biyokimya alanında çok büyük gelişmeler olmuştur. Çok fazla sayıda yeni enzimlerin bulunmasından dolayı birtakım düzenlenmelerin yapılması gerekli

olmuştur. Bu sebepten çeşitli kuruluşlara bir araya gelerek enzim sistematiği ve sınıflandırmasını düzenlemek için Enzim Komisyonu (EC) oluşturmuştur (Singh vd. 2016). Enzimlere reaksiyon tipi, fonksiyonel sınıf, substrata ve spesifik reaksiyona göre bir sınıflandırma, adlandırma yapılmıştır (Akkaya ve Pazarlıoğlu 2014). Her enzim tanımı E.C. ön eki ile başlayarak aralarında nokta bulunan 4 rakamdan oluşmaktadır.

1. İlk sayı enzimin 7 sınıftan hangisinde olduğunu belirtir.
2. İkinci sayı alt sınıfı tanımlar.
3. Üçüncüsü ait olduğu diğer alt grubun tanımıdır.
4. Dördüncü ise enzim alt sınıfının seri numarasını anlatmaktadır (Çakmak 2018).

Şu ana dek Enzim Komisyonu 3000'den fazla enzim için sınıflandırma yapmıştır. 2018 yılına kadar 6 sınıfa ayrılırken 2018'den sonra enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre 7 sınıfa ayrılmıştır. Bunlar transferazlar, liyazlar, izomerazlar, ligazlar, oksidoredüktazlar, translokazlar ve hidrolazlardır. Proteazlar ise bu sınıflardan hidrolazlar grubundadır (Okpara 2022)

Hidrolazlar, su molekülleri ile bağların ayrılmasını hidrolize olmasını sağlarlar. Büyük moleküllerden daha küçük moleküllerin oluşmasına neden olurlar. Proteazlar, lipazlar, amilazlar, fosfotazlar, fosfolipazlar ve laktazlar hidrolazlara örnek olarak gösterilebilirler (Koç 2015). Proteazların peptitlerin hidrolizindeki tercih edilme nedenleri, kimyasal hidrolize göre oldukça önemlidir. Bu tercih edilme, proteazların spesifikliği ile yakından ilişkilidir. Proteazlar, spesifik bir şekilde belirli peptit bağlarını hidrolize edebilme yeteneğine sahiptir ve bu özgünlük bir dizi faktöre bağlıdır. Öncelikle proteazların spesifikliği fonksiyonel grupların özelliklerine, substratların boyutuna, amino asitlerin yapılanışına bağlıdır. Proteazlar hangi peptit bağlarını kesebileceğini, moleküllerin yapısal özellikleri belirler. Bu durum kimyasal hidrolizde olmayan bir özelliktir. Kimyasal hidroliz genellikle tüm peptit bağlarını benzer şekilde parçalayabilir ancak proteazlar belirli peptit bağlarını hedef alarak daha seçici bir şekilde işlev görür (Motyan vd. 2013; Aran 2014).

2.6 Mikrobiyal Enzimler

Enzimler insanlar, hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Enzim üretimi için kullanılacak bitkisel ve hayvansal kaynaklı dokular kısıtlı olmasından dolayı mikrobiyal enzimler endüstride daha fazla kullanılmaktadır. Birçok dış faktörden etkilenen bitkisel ve hayvansal enzimler iklime, mevsimlere, toprak alanına, işgücüne bağımlı olarak üretim miktarları ve verimleri değişmektedir. Bunun yanında bitkisel kaynaklı enzim sayı olarak çok azdır. Mikroorganizmalardan elde edilen enzim sayısı çok fazladır ve miktarı da çoktur. Mikroorganizma suş seçimi planlı yapılırsa verim ve enzim miktarı doğru orantılı artarak ekonomik olarak başarılı enzim üretimi gerçekleştirilmektedir (Topal 1985; Hammamchi 2014).

Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin diğerlerine göre avantajları vardır. Bu yüzden günümüzde çok tercih edilmektedirler.

1. Çok az yer kaplamaları
2. Çeşitlerinin fazla olması
3. Basit kültür yöntemleri ile üretilebilir olması
4. Kısa sürede yüksek miktarda enzim üretebilmeleri
5. Maliyetlerinin düşük olması
6. Daha kararlı ve aktif olmaları
7. Uzun raf ömrüne sahip olmaları ve sonraki işlemlere daha kolay izin vermeleri nedeniyle mikroorganizma kaynaklı enzimleri ön plana çıkarmaktadır.

Bu sebeplerden endüstride en çok tercih edilenler mikrobiyal enzimlerdir (Rao vd. 1998; Anbu vd. 2017; Sharma vd. 2017; Wen vd. 2022).

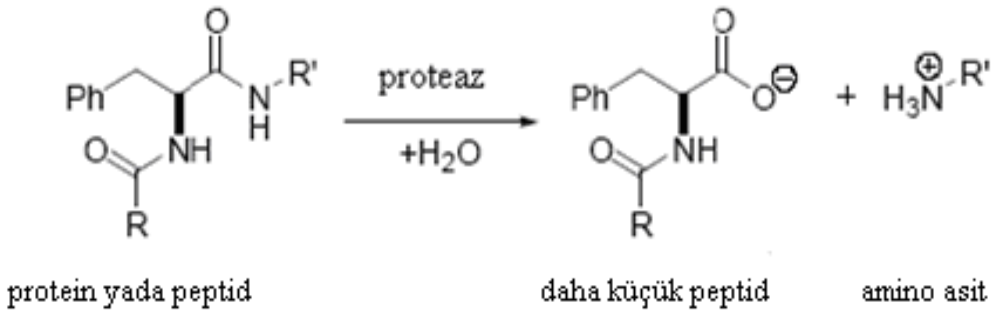
Mikrobiyal enzimler mayalar, küfler ve bakterilerden edilebilmektedirler. Elde edilen enzim miktarları bu mikroorganizmaların cins ve türlerine göre farklılık gösterebilirler. Bu yüzden üretim aşamasına geçileceği zaman istenen enzimin hangi mikroorganizmadan ne kadar elde edilebileceği tespit edilmelidir. Ancak

mikroorganizmanın üretebileceği enzim miktarı ortam koşullarına ve zamana göre farklılıklar gösterebilmektedir (Aslan ve Sekin 1985).

Ticari olarak en çok kullanılan enzimler hidrolazlardır. Hidrolazlar ise hücre dışı (ekstrasellüler) enzim olarak kullanılmaktadır. Ekzoenzimler ise hücre duvarının dışı ile besiyeri arasında bağlantılı olan enzimlerdir. Bu enzimlerin substrat seçicilikleri azdır. Farklı birçok işlemde kullanılmaya uygundurlar. Fakat hücre dışı enzimlerin besiyeri ortamında diğer proteinlerden ayrılıp saflaştırılması zordur. Bu saflaştırma işlemi enzim üretimim maliyetinin en yüksek kısmını oluşturmaktadır (Gimenes vd. 2019, Kıran ve ark. 2006). Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerde en büyük pay proteazlar (%59) sahiptir. Ardından sırasıyla karbohidrazlar (%28), lipazlar (%3) ve diğer enzimler (%10) oluşturmaktadır. Mikroorganizma kaynaklı proteazlar kullanım alanlarının genişliği, elde edilmesinin kolay olmasından dolayı en önemli hidrolazların en önemli grubunu oluşturmaktadır (Woodley 2000).

2.7 Proteazlar

Proteazlar (EC 3.4) proteinlerdeki peptit bağlarının hidrolitik olarak ayrılmasını katalize eden enzimlerdir. Daha küçük polipeptitler ya da amino asitler elde etmek için kullanılırlar.



Şekil 2.1 Proteazların peptid bağını hidrolize etme mekanizması (Okpara 2022)

Proteolize karşı dayanıklı çok az protein vardır ve sonunda hemen hemen hemen tüm proteinler, organizma içinde tekrar kullanılabilir hale gelmesi için aminoasitlere ayrıştırılırlar (Rawlings 2013).

Hidroliz reaksiyonları biyolojik maddeleri faydalı molekülerle dönüştüren tepkimeler olarak adlandırılır. Bu reaksiyonda rol oynayan en önemli enzim proteazdır. Proteazlar ayrıca proteinazlar veya peptidazlar olarak da bilinirler. Proteaz enzimi büyüme ve çoğalma süreçlerinin tüm canlı organizmalar için elzem olduğu bir enzimdir. Ayrıca fizyolojik ve ticari açıdan son derece kritiklerdir. Bu enzimler genellikle canlı organizmaların pankreas ve midesinde üretilirler. Spesifik hidroliz reaksiyonları için kullanılan farklı proteazlar da bulunmaktadır. Bu enzimler vücudun diğer bölgelerin de de üretilir. Bazı hormonların işlevi, kan pıhtılaşma süreci, bağışıklık sistemini aktive etmek, hücrelerin yok edilmesi gibi olaylar proteazlar tarafından düzenlenir (Gerze 2003; Bulut 2007).

2.8 Proteazların Sınıflandırılması

Proteazlar, Uluslararası bir sınıflandırma sisteminde hidrolazların altında yer almaktadır. 3. Grubun (EC 3) 4. alt sınıfı (EC 3.4) olarak yer almaktadırlar (Tekin 2008). Proteaz enziminin etkinliği, reaksiyon ortamının pH durumuna bağlıdır. Bu nedenle proteazlar;

- Alkali proteazlar (pH>7)
- Yüksek alkali proteazlar (pH>10)
- Nötr proteazlar (pH=7 civarı)
- Asidik proteazlar (pH<7) olarak sınıflandırılabilir (Sumantha vd. 2006).

Proteazlar katalitik aktivitelerine göre 2 ana kategoriye ayrılmaktadırlar. Endopeptidaz ve ekzopeptidaz olarak ayrılan proteazlar bunların alt grupları da olacak şekilde tablodaki gibi sınıflandırılmıştır (Rao vd. 1998).

Çizelge 2.2 Proteazların Sınıflandırılması (Rao vd. 1998)

Proteazlar	**E.C Kodu**
Ekzopeptidazlar	
Aminopeptidaz	3.4.11
Dipeptidilpeptidaz	3.4.14
Tripeptidilpeptidaz	3.4.14
Karboksipeptidaz	3.4.16-3.4.18
Serin proteaz	3.4.16
Metaloproteaz	3.4.17
Sistein proteaz	3.4.18
Peptidildipeptidaz	3.4.15
Dipeptidaz	3.4.13
Omega peptidaz	3.4.19
Endopeptidazlar	3.4.21-3.4.34
Serin proteaz	3.4.21
Sistein proteaz	3.4.22
Aspartik proteaz	3.4.23
Metalo proteaz	3.4.24
Endopeptidaz (Bilinmeyen katalitik mekanizmanın)	3.4.99

2.8.1 Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar polipeptid zincirinin uç bölümlerine etki ederek aktivite gösterirler. Bu etkiye bağlı olarak üç kategoriye ayrılırlar: aminopeptidazlar, karboksipeptidazlar ve omegapeptidazlar.

Aminopeptidazlar, serbest N-terminus kalıntısını hedef alan ve tripeptid, dipeptidyada bir amino asit kalıntısı serbest bırakan ekzopeptidazlardır. Aminopeptidazlar, bakteri ve mantarlar dahil olmak üzere birçok mikrobiyal türde bulunur. *Aspergillus oryzae*'nin ürettiği hariç genellikle aminopeptidazlar hücre içi enzimlerdir. Aminopeptidazlar ise katalizledikleri bölgeye göre dipeptilpeptidaz ve tripeptilpeptidaz olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (Rao vd. 1998).

Karboksipeptidazlar, proteinlerin polipeptid zincirlerini serbest karboksil uçtan hidroliz eden özel enzimlerdir. Bu enzimler, genellikle tek bir amino asit veya bir dipeptidi ayırmak için özelleşmişlerdir. Karboksipeptidazlar, serin proteazlar, metaloproteazlar, sistein proteazlar, peptidil dipeptidazlar, dipeptidazlar olarak alt sınıflara ayrılmışlardır (Duran vd. 2007). Prostetik gruplara bağlı amino asitlerin peptit bağlarını hidrolize eden enzimler omegapeptidazlardır (Rao vd. 1998).

2.8.2 Endopeptidazlar

Endopeptidazlar, ekzopeptidazların aksine polipeptid zincirlerinin iç ve orta kısımlarındaki peptit bağlarını ayıran enzimlerdir. Etrafta karboksil grubu ve amino grubu olması aktivitelerini olumsuz etkileyebilir (Alpan 2008; Tekin 2008; Souza vd. 2022). Sistein proteaz, Metalo proteaz, serin proteaz, aspartik proteaz olmak üzere dört kısımda incelenmektedirler. Bir de katalitik mekanizması bilinmeyen farklı bir grup endopeptidazlar da burada yer almaktadır (Tanksale 2001).

Serin proteazlar genellikle ökaryotlar ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan enzim türüdür. Bu proteazlar osteolitik ve emidaz aktivite dahil geniş bir substrat spesifikasyonu sergilerler. Genellikle pH 7.0 ve pH 11.0 arasında olmak üzere geniş bir aktivite gösterme aralıkları vardır. Bu sebeple aşırı reaksiyon koşullarında yüksek aktivite ve stabilite gösterdiklerinden ticari olarak en çok kullanılan enzimlerden olmuştur (Rao vd. 1998; Johannes ve Zhao 2006).

Sistein proteazlar diğer bir adıyla tiyol proteazlar olarak da bilinirler. Aktif bölgesinde bulunan bir sistein kalıntısının yan zincirlerini içeren yapıya sahiptirler. Sistein proteazlar sindirim için az kullanılmaktadırlar. Genellikle hücresel proteinlerin dönüşümü sürecinde yer alan geniş bir enzim ailesi olarak hücre içi olarak kullanılırlar. Genellikle doğal kaynaklardan elde edilirler (Gerze 2003).

Aspartik proteazlar, asidik proteazlar olarak da bilinir ve katalitik aktivitelerini yerine getirebilmek için aspartik asit amino asitlerine ihtiyaç duyan enzimlerdir. Pepsin,

retropepsin ve para-retrovirüslere ait enzimler olmak üzere üçe ayrılırlar. İzoelektrik noktaları genelde pH 3.0 ve pH 4.5 arasındadır. Birçok aspartik proteaz özellikler pH 3.0-4.0 civarında optimum aktivite göstermektedir. Bu proteazlar pepstatin, diazoasetilnorlösin metil ester 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan gibi bileşikler tarafından inhibe edilebilirler (Fitzgerald vd. 1990; Rawlings 2013).

Metalo proteazların katalitik aktivasyonları için manganez, kobalt ve çinko gibi iki değerli iyonlar gereklidir. Kalsiyum stabilite, çinko ise aktivite için kullanılan asli iyonlardır. Metalo proteazlar yüksek organizmalardan gelen kolajenazlar ve bakteri kaynaklı termolizin gibi değişik kaynaklardan gelen enzimleri içerirler. Bu enzim grubunun çoğu nötr ve alkali pH seviyelerinde en yüksek aktivite sergiler. Farklı metal iyonlarının katalitik mekanizma sırasında kelatlayıcı ürünlerin tutma etkisi sebebiyle, metalo proteazlar kelatlayıcı ajanlara karşı hassastır ve bu ajanların enzim üzerinde inhibe edici etkisi bulunmaktadır. Bu ajanlardan en önemlisi EDTA'dır (Saravanamuthu 2010; Vronova 2013; Srilakshmi 2015).

2.9 Proteaz Enzim Kaynakları

Proteazlar bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma (bakteriler, mayalar, küfler) kaynaklı olarak üç ana sınıftan elde edilirler. Kaynağına göre aktivite gösterdikleri pH aralıkları değişiklik göstermektedir. Fungal kaynaklı pH 3.5-5, bakteri kaynaklı pH 6-11, hayvansal kaynaklı pH 7.5-8.5 arasında aktifdirler (Afşar vd. 2003). Günümüzde tanımlanan çok fazla proteaz çeşidi bulunmaktadır. Bu proteazlardan %59'u bakteri, %25'i hayvan, %12'si mantar ve bitki ve %4'ü arke, virüs ve protoza kaynaklıdır. Çeşitli kaynaklardan elde edilen proteaz enzimleri ticari olarak endüstride kullanılmaktadır. Bu yüzden endüstride ekstrem koşullara karşı dayanıklılığı yüksek enzimler ön plana çıkmıştır (Ghafoori vd. 2016). Farklı kaynaklardan elde edilen enzimler ve elde edildiği kaynağı Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3 Proteaz Kaynakları (Naveed vd. 2020)

Proteaz Kaynakları		
Hayvan	**Bitki**	**Mikroorganizma**
DAPaz	Bromelain	Subtilizin
Elastaz	Papain	Proteinaz K
Entorokinaz	Ficin	WNV Proteaz
Faktör X		Rinovirüs 3C
Katepsin C		TEV Proteaz
Katepsin D		TVMV Proteaz
Kimotripsin		Termolizin
Pepsin		Kollajenaz
Tripsin		Dispaz
Trombin		
Renin		

2.9.1 Bitkisel proteazlar

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılması bazı koşullara göre değişmektedir. Bitkinin iklim koşulları, yetiştirme, büyüme hızı, toprak çeşidi vb. faktörler enzimi etkilemektedir. Bu proteazlar genelde tropikal bitkilerden elde edilmektedirler. En çok bilinen bitkisel proteazlar papain, bromelain ve ficindir (Ward 1985). Bitkisel ürünler gıda uygulamalarında doğal ve güvenli olarak kabul edilirler. Fakat bromelain ve papain çözünür katıların yoğunlaştırılması ya da viskozitelerinin azaltılması uygulamalarında maliyet açısından etkin performans sergilemezler. Diğer bir dezavantaj ise bitkilerden proteaz üretiminin uzun sürmesidir (Rao vd. 1998).

2.9.2 Hayvansal proteazlar

Bu tür enzimler büyük miktarlarda ve saf olarak elde edilebilirler. Fakat bu enzimlerin elde edilmesi kesilen hayvan miktarına doğru orantılı olarak bağlıdır (Ellaiah vd. 2002). Rennin, pepsin ve kimotripsin örnek olarak verilebilir. Kimotripsin, pankreastan elde

edilen bir enzimdir. Bu enzimler aromatik halkalara sahip olan amino asitlerin karboksil gruplarındaki peptit bağlarını hidrolize ederler (Rao vd. 1998).

Pepsin, asidik bir proteaz enzimidir. Midede HCl bulunması durumunda pepsinojen formundan pepsine dönüşür ve aktif olur. İki hidrofobik amino asit arasındaki peptit bağlarını hidroliz ederler (Rao vd. 1998).

Rennin anne sütü ile beslenen memelilerde aktif olarak midede bulunur. Anne sütünü sindirmede yardımcıdır. Kompleks bir enzimdir ve sütü pıhtılaştırır. En yaygın kaynağı ise yeni doğan ve sütle beslenmiş buzağıdan elde edilen şirdenidir (Fankhauser 2007).

2.9.3 Mikrobiyal proteazlar

Mikrobiyal proteazlar, hidrolitik enzimler arasında son derece önemli bir gruptur. Bu enzimler mikroorganizmaların ürettikleri ve keşfedilmemiş proteazların önemli kaynakları olduğu bilinen bir gerçektir. Endüstriyel uygulamalarda geniş bir yelpazede kullanılabildikleri birçok alanda bu proteazların değeri defalarca kanıtlanmıştır. Gıda endüstrisinde peynir üretiminden bira yapımına kadar geniş yelpazede kullanılmaktadırlar. Aynı zamanda deterjan endüstrisinde, tekstil endüstrisinde ve ilaç üretiminde de önemli rol oynarlar. Mikroorganizmaların doğal olarak ürettikleri proteazların yanı sıra genetik mühendislik teknikleriyle de özelleştirilebilirler, bu da belirli endüstriyel ihtiyaçlara uygun enzimlerin tasarlanmasını sağlar (Souza vd. 2022). Mikrobiyal proteazlar için ana enzim kaynakları mayalar, küfler ve bakterilerdir. Bu mikroorganizmalar doğada yaygın olarak bulunurlar ve proteaz üretiminde kritik bir rol oynarlar. Mikrobiyal proteazlar, endüstriyel enzim pazarında önemli bir lider konumda bulunmaktadır ve dünya genelindeki toplam enzim satışının büyük bir kısmını oluşturarak (yaklaşık %60) bir paya sahiptir (Rai ve Mukherjee 2010).

2.9.3.1 Bakteriyel proteazlar

Endüstriyel alanda üretilen proteazların büyük bir çoğunluğu, genellikle *Bacillus* cinsi tarafından üretilen mikroorganizmalar tarafından sağlanır. Mikroorganizmalar arasında birçok tür proteaz üretebilir; ancak endüstriyel açıdan önemli olanlar yeterli miktarda hücre dışı enzim üretebilen türde mikrooganizmalardır. Bu anlamda *Bacillus* cinsi bakteriyel proteazların üretiminde öne çıkar (Kim vd. 2016; Si vd. 2018). Endüstride kullanılan proteazlar bakteriyel nötral ve alkalin olarak iki sınıfta incelenmektedir. (Kumar ve Takagi 1999).

Bakteriyal nötral proteazlar, genellikle pH 5.0 ile 8.0 arasındaki ortamlarda etkili olan ve termotoleransı daha düşük olan enzimlerdir (Razzaq vd. 2019). Bu proteazlar, orta düzeyde reaksiyon hızına sahiptir. Bu özelliği ile gıdalarda kullanmak için hayvansal proteazlardan daha avantajlıdır. Bakteriyel proteazlar tarafından hidrolize uğramış gıdalar, hayvansal kaynaklı enzimlere göre daha az acımsı tat oluşturdukları için gıda endüstrisinde talep görmektedirler (Rao vd. 1998).

Bakteri kökenli alkalen proteazlar pH 9.0-11.0 arasında etkili olurlar. Optimal pH değerleri 10.0 civarındadır. Bu proteazlar, geniş substrat spesifikliği ile bilinirler. Endüstriyel enzimlerin büyük kısmının *bacillus* cinsi bakterilerden üretilmesinin sebebi; diğer mikroorganizmalara kıyasla üretim kapasitesinin ve aktivitesinin yüksek olmasıdır (Razzaq vd. 2019; Sharma vd. 2019).

2.9.3.2 Fungal proteazlar

Funguslar insanlık tarihi boyunca bira, şarap, ekmek ve peynir gibi önemli gıda ürünlerinin yapımında temel rol oynamıştır. Ayrıca endüstriyel süreçlerde de enzim, vitamin, polisakkarit, alkol, pigment, lipid ve glikolipid üretiminde yaygın olarak kullanılır. Bu bileşenler ticari ve biyoteknolojik alanlarda değerlendirirken, funguslardan elde edilen bazı sekonder metabolitler yüksek besin değeri taşır ve insan sağlığına katkı sağlar. Funguslar, gıda üretiminden sağlık alanına kadar geniş bir alanda fayda sağlayan

önemli mikroorganizmalardır. Özellikle sitrik asit üretiminde ve bazı peynir türlerinin yapımında yaygın olarak funguslar kullanılırlar. Yararlı antibiyotiklerin (penisilin), vitaminlerin (thiamin, biotin), ilaçların (ergotamin, kortizon), enzimlerin ve hormonların (gibberellin) üretiminde de mikrofunguslar kullanılır. Genetik çalışmalarda da kullanılan funguslar bilim ve endüstriye önemli katkılar sağlayarak modern teknolojinin birçok alanında temel bileşen haline gelmiştir (Adrio ve Demain 2003; Ghorai vd. 2009; Akkara ve Tosun 2014).

Küfler, fungi alemi içinde yer alır ve çok hücreli organizmalarıdır. Spor üretirler ve sporla çoğalırlar. Milyonlarca spor üretebilen bu yapılarla çok hızlı şekilde yayılırlar. Nem, sıcaklık, oksijen gibi çevresel faktörlere bağlı olarak gelişimleri değişir. Küfler çeşitli enzimleri kullanarak organik maddeleri parçalarlar. Bu şekilde besin elde ederler. Beslenme süreçlerinde oluşturdukları ürünler arasında alkoller, organik asitler, enzimler bulunur. İkinci yan ürün olarak da mikotoksinleri üretebilirler (Şahin ve Körüklüoğlu 2000). Küfler proteaz, lipaz ve amilaz enzimlerini salgılarlar. Gıdanın sindirilebilirliğini arttırırlar, aynı zamanda ürünün aromatik olarak daha iyi olmasını sağlarlar. Kullanılan küfler üründe tat, aroma, renk ve tekstür özelliklerinin oluşmasında/değişmesinde etkilidirler (Vural ve Öztan 1996).

Kültür olarak kullanılabilen küflerde patojenik ve toksikolojik olmama; proteolitik, lipolitik ve amilolitik aktiviteye sahip olma; oluşacak üründe beklenen tat, aroma ve görünüşü sağlama; gıda içinde ve dışında gelişebilme, diğer mikroorganizmalardan etkilenmeme; antibiyotik ve metabolitler üretmeme, aranan özelliklerdir. Bu anlamda kullanılanlar *Penicillium, Aspergillus, Rhizopus, Actinomucor, Amylomyces, Neurospora* ve *Mucor* cinsi küflerdir (Yetim ve Çakmakçı 1997). Bu cinsler arasında *Aspergillus* ucuz tarımsal atıkları kullanarak büyük ölçüde ekstraselüler enzim üretebilme yeteneği sebebiyle tercih edilir. *Aspergillus oryzae* asidik, nötral ve alkalen proteaz üretebilme yeteneğine sahiptir. Bunun anlamı bazı fungus türlerinin çok geniş pH (3.0-12.0) aralığında proteaz üretebilir ve geniş substrat çeşitliliğine uyum sağlayabilirler (Vishwanathavd. 2009; Yadav vd. 2019). Küfler tarafından üretilen asidik proteazlar pH 4.0-4.5 arasında en iyi performanslarını sergiler. Bu nedenle küf kaynaklı asidik proteazlar özellikle peynir yapımında tercih edilir (Rao vd. 1998).

Fungal asidik proteazlar, pH 3.8 ile 5.6 arasında etkinlik gösterirken en iyi performansı pH 4.0 ile 4.5 arasında sergilerler. Bu enzimlerin üretimi için *Aspergillus, Penicillium, Humicola, Phanerochaete, Endothia, Rhizopus ve Thermoascus* türleri kullanılmaktadır (Souza vd. 2015; Razzaq vd. 2019).

Fungal nötral proteazlar, aktivitelerini pH 6.0 ile 8.0 arasında sürdürebilir ve en iyi performansı genellikle pH 7.0'de gösterirler. Bu proteazlar genelde metallo proteazlar olarak bilinirler. *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri kullanılarak nötral proteaz üretilmiştir (Wang vd. 2007).

Fungal alkalen proteazlar, aktivitelerini pH 8.0 ile 13.0 arasında sürdürebilirler. Bu proteazlar özellikle *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri olmak üzere *Beauveria, Botrytis, Conidiobolus, Engyodontium, Metarhizium, Myceliophthora* cinsleri kullanılarak da üretilebilirler (Sandhyavd. 2005; Vranova vd. 2013).

Peynirin olgunlaşması sırasında biyokimyasal değişiklikler, birincil (primer) ve ikincil (sekonder) olaylar olarak gruplandırılabilir. Birincil olaylar glikoliz, lipoliz ve proteoliz gibi enzimatik reaksiyonlar olarak sıralanabilir (Neves vd. 2010). İkincil olaylarda ise yağ asitlerinin ve amino asitlerinin katabolizması bulunmaktadır. İkincil biyokimyasal olayların ürünleri birçok uçucu tat bileşiğinin gelişimini doğrudan etkiler (McSweeney ve Sousa 2000). Mikroorganizmalar peynirin olgunlaştırılmasında ikincil starter kültür olarak kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmalar, birincil asit üreten başlangıç kültürlerinin karışımlarına eklenen katkı maddeleri olarak bilinçli bir şekilde kullanılırlar (Parente ve Cogan 2004). Laktik asit üretimine herhangi bir fonksiyonları olmamakla beraber sadece olgunlaşmada yer alırlar. Temel rolü çeşitli enzimatik sistemleri aracılığıyla biyokimyasal değişikliklere katkıda bulunmaktır (El-Soda vd. 2000). Bu mikroorganizmalar süt içine dahil edilebileceği gibi peynirin yüzeyine bilinçli bir şekilde uygulanabilirler (Fox vd. 2000; Cogan 2014). Mavi, peynirlerde, *P. roqueforti*, Camembert peynirinde *P. camemberti* ve İsveç tipi peynirde *Propionibacterium freudenreichii sp. shermani* en çok kullanılan ikincil suşlardır (Öztürkoğlu Budak 2016).

İleri enzimatik faaliyetleri (lipolitik ve proteolitik) ile peynire has tat, koku ve aroma kattığı için *Penicillium* cinsi küfler olgunlaşma aşamalarında kullanılmaktadır. Peynirin olgunlaşma süreci, süte maya ilave edilmesiyle başlar ve belirli bir zaman alır. Bu süreçte makro moleküllü peptitler aminoasitlere kadar parçalanır. Lipidler serbest yağ asitlerine dönüşür ve laktoz pirüvik, laktik aside dönüşür. Bu olaylar peynirin aromasını oluşturan amino asitler, serbest yağ asitleri, organik asitler ve uçucu maddelerin oluşumuna yol açar (Hayaloğlu ve Özer 2011). Dünyada *P. Roqueforti* suşları Rokfor, Gorgonzola, Stilton ve Danish Blue gibi peynirlerde kullanılmaktadır (Kavanagh 2011). Üretimde kullanılan farklı suşlar, peynirde çeşitli renklerde küflerin oluşmasına neden olabilir. Peynir çeşidi olarak Gorgonzolada sarımsı ya da mavi renk geliştiren *P. roqueforti* suşu tercih edilirken, koyu yeşil renk geliştiren suşlar Stilton, Danablu veya Raquefort tarzı peynirlerde kullanılır (Hayaloğlu ve Özer 2011).

Peynir olgunlaşmasındaki en önemli biyokimyasal olaylardan biri proteolizdir ve peynir proteinlerinin hidrolizini içerir. Su içermeyen büyük peptitlerden orta ve küçük çözünebilir peptitlerin ve serbest amino asitlerin oluşmasına yol açar. Ayrıca proteoliz genelde peynirin duyusal ve dokusal özelliklerinin gelişimi için en önemli süreç olarak kabul edilir (Fox 1989; McSweeney 2004). Proteoliz ikincil mikrobiyatadan gelen proteaz ve peptidazlar tarafından katalize edilir. Özellikle yüzey küfü ile olgunlaşmış peynirlerde çok güçlü proteolitik sisteme sahip ikincil kültürleri nedeniyle geniş çaplı proteoliz meydana gelir (Fox vd. 2000). Proteoliz peynir olgunlaşmasına şu yollarla katkıda bulunur:

1. Peptid ve amino asit oluşumu yoluyla doğrudan lezzet katkısı veya amin asit, tiyoli tiyoester vb. yoluyla dolaylı katkı,
2. Çiğneme sırasında daha fazla duyusal bileşiğin salınması,
3. NH_3 oluşumu yoluyla pH değişiklikleri,
4. Protein ağı ayrışması, pH artışı ve yeni oluşan amino ve karboksil grupları tarafından daha fazla su bağlanması nedeniyle peynirin dokusunda değişiklikler (Fox 1989; McSweeney 2004).

Proteolizin geniş çaplı bir göstergesi de aminoasit katabolizması olup küf ile olgunlaşan peynirlerde çok önemlidir (Fox vd. 2000). Amino asitlerin katabolizması transaminasyon, dekarboksilasyon, desülfürasyon, deaminasyon ve amino asit yan zincirlerinin hidrolizi gibi süreçleri içerir. Bu süreçlerin sonunda karboksilik asitler, aminler, NH_3, CO_2, aldehitler, alkoller, tiyoller, sülfür bileşikleri, fenoller ve hidrokarbonlar gibi geniş bir bileşik yelpazesi üretilir ve bunlar birçok peynir çeşidinde özellikle önemlidir (Fox vd. 2000; Yvon ve Rijnen 2001).

2.9.3.3 Viral proteazlar

Bu proteazlar virüslerin genetik materyalleri DNA ve RNA tarafından kodlanırlar. Hücre içi enzimlerdir (Steinkuhler 2008). Viral proteazlar, AIDS ve kanser gibi hastalıkların artmasıyla yakından ilişkili olduğu düşünülmüştür ve bu hastalıklara neden olan virüs proteinlerinin fonksiyonlarını anlaşılması açısından büyük bir önem taşırlar. Pek çok virüste, serin, aspartik ve sistein peptidazları bulunur ve tüm bu enzimler endopeptidaz ailesindendir. Bu tarz hastalıkların yayılması ve ölümcül etkilerini engellemek amacıyla etkili inhibitörlerin tasarımı mümkün kılabilmek için viral proteazların üç boyutlu yapısına ve bu yapıların sentetik inhibitörlerle etkileşimine odaklanmıştır (Rao vd. 1998).

2.10 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Kültür ortamlarından elde edilen süpernatantlar sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile proteaz enzim aktivitesinde proteinlerin boyutlarından yola çıkarak değerlendirme yapmak için kullanılmıştır. Numuneyi denatüre edici ve indirgeyici koşullar altında ısıtarak proteinler açılır ve SDS molekülleri ile kaplanır, polipeptit zincirinin uzunluğuna orantılı yüksek bir negatif yük kazanır. Bir jel matrisine yüklenip elektrik alanına yerleştirildiğinde, negatif yüklü protein molekülleri pozitif yüklü elektroda doğru göç eder ve moleküler elek süzme etkisiyle ayrılır. Protein spesifik bir boyama tekniği ile görselleştikten sonra, proteinin göç mesafesinin bilinen moleküler ağırlığına sahip bir standartla karşılaştırarak protein boyutu tahmin edilebilir (Sambrook vd. 1989; Roy ve Kumar 2014).

SDS-PAGE ile geniş bir protein yelpazesini ayırmak için en yaygın kullanılan jel sistemi Laemmli sistemidir. Bu sistem, bir yığın jel bileşeni (proteini elektroforetik koşunun başında keskin bantlara odaklamaya yardımcı olan) ve proteinleri ağırlıklarına göre ayırmak için değişen akrilamid jel yüzdelerini içeren bir çözelti jelinden oluşan tris-glisin jelleri kullanılır. Bu klasik sistem kullanılan tampon sisteminin pH'sı ve iyonik gücünün, jeli çalıştırmak için kullanılan tamponlardan (Tris pH 8.3) farklı olduğu bir kesikli, tampon sistemi kullanır. Yığın jel için kullanılan tamponun pH'sı (Tris pH 6.8) ve çözelti jel (Tris pH 8.8) için kullanılan tamponlar farklıdır (Laemmli 1970).

2.11 Proteazların Kullanım Alanları

Proteazlar, gıda sanayinde kullanılan en önemli gruplarından biridir. Endüstriyel proteazlar dünya genelinde endüstriyel enzim pazarının %65'ten fazlasını oluşturan en geniş kategoriye aittir. Proteazlar geniş substrat özelliklerinden dolayı deri işleme, deterjan endüstrisi, protein hidrolizatlarının üretimi, farmasotik endüstri, biyosentez, biyotransformasyon ve gıda endüstrisi gibi birçok endüstriyel uygulamada kullanılmaktadır (Agrawal vd. 2004; Fogarty ve Kelly 2012; Wang vd. 2009).

2.11.1 Gıda endüstrisi

Proteazlar gıda endüstrisinde aroma ve olgunlaştırma amacıyla kullanılır. Süt ve süt ürünleri endüstrisinde pıhtı oluşumunu artırma, olgunlaştırmayı hızlandırma, raf ömrünü uzatma, aroma, lezzet ve renk gibi özellikleri geliştirmede rol oynar. Rennet, kimozin ve pepsin enzimlerinin kombinasyonundan oluşur. Peynir üretiminde kullanılan mikrobiyal rennet üretilen peynirlerin %33'ünde kullanılmaktadır (Qureshi vd. 2015). Peynir yapımında kullanılan proteazların temel görevi proteinlerdeki peptit bağlarını hidroliz ederek sütün pıhtılaşmasını sağlamaktır. Peynir üretiminde genellikle asidik proteaz olan ve kazeine karşı yüksek özgüllük gösteren kimozin kullanılır. Kimozindeki artış geç olgunlaşma ve lezzeti arttır. Zamanla genetik olarak güvenli kabul edilen organizmalar aracılığıyla rekombinant kimozin üretimi başlamıştır (Akın 2003; Çakmakçı vd. 2017; Souza vd. 2022).

Fırıncılıkta proteazlar ekmeğin kalitesini ve esnekliğini arttırmak için kullanılır. Ayrıca proteazlar gluteni sindirebilirler, bu yüzden çölyak hastalığı olanlar için glutensiz yiyeceklerin üretilmesine olanak tanır (Kieliszek vd. 2021; M'hir vd. 2014). Bisküvi sanayisinde sıkça kullanılan proteazlar hamurda yumuşamayı geciktirmek için kullanılırlar. Bu yüzden özellikler kraker üretiminde çok önemlidir (Fogarty ve Kelly 2012).

Et ve et ürünlerini yumuşatmak amacıyla proteazlar kullanılır. Bunun için mikrobiyal ve bitkisel proteazlar kullanılır. Yumuşatma için iyi bir sonuç almak için bitkisel proteazlar ağırlıklı olmak üzere bitkisel ve mikrobiyal proteazların birlikte kullanılması gerekmektedir (Abdel-Naaem ve Mohamed 2016).

Bira üretim aşamalarında proteazlar kullanılmaktadır. Bitkisel proteazlar malt yapım ve mayşeleme aşamalarında kullanılır. Fisin ve papain gibi proteazlar fermentasyonu ve malt üretimini iyileştirmek, depolamada kalite arttırmak için kullanılmaktadırlar. Ayrıca birada önemli bir kriter olan berraklık için proteazlar kullanılır. Proteinler proteaz ile çözünerek bulanıklık azaltılır. Ayrıca meyve suyu diğer alkollü içeceklerde de berraklık için proteazlar kullanılır (Gomaa 2018).

Yüksek protein içeriğine sahip olan soya fasulyesinden elde edilen soya soslarında proteaz enzimleri kullanılmaktadır. Alkali ve nötral proteazlar (fungus kaynaklı) bu sosların yapımında kullanılmaktadırlar. Bu anlamda en çok kullanılan tür *Apergillus oryzae*'dir (Machida vd. 2005).

2.11.2 Deterjan endüstrisi

Enzimlerin kullanıldığı endüstriyel uygulamaların başında deterjan endüstrisi gelmektedir. Toplam enzim kullanımının %25-30'unu oluşturmaktadır. Proteazlar kan, vücut salgıları ve çeşitli yemek lekelerini sindirmektedirler. Yıkama verimliliğini arttırmak için deterjan formül reçetelerinde temel bileşen olarak proteazlar kullanılmaktadır. Deterjan formüllerinde bu enzimlerin kullanılabilmesi için az miktarda

kullanılmalı, sıcaklık ve pH olarak geniş aralıkta aktif olmalıdırlar (Baweja vd. 2016; Cherif vd. 2011; Grbavčić vd. 2011; Sumantha vd. 2006).

2.11.3 Tekstil endüstrisi

Proteaz enzimi, düşük sıcaklarda yıkandıktan sonra yün ve ipek kumaşların kalitesini koruyarak kumaşların ömrünü artırabilir. Kimyasalların yerine kullanılabilirler. Bazı kumaş türlerinin solma, ağartma işlemleri için ve biyolojik olarak temizliklerinde kullanılırlar. Ayrıca proteaz enzimleri poliamid yüzeyini hidroliz yaparak kumaşların kimyasallar kullanılmadan işlenmesini sağlar, bu da etkili tekstil üretimini kolaylaştırır (Alan vd. 2022; Furhan 2020). Kumaş üretimi için gereken malzemeler yün, ipek, kaşmir gibi farklı lif yapılarına sahiptir. Protein tabanlı liflerin özellikleri amino asit türü, miktarı ve konumuna bağlı olarak belirlenir. Bu özelliklere göre yün esaslı ürünler liflerin esnekliğini sağlamak, doğal kirden arındırmak ve daha beyaz bir renk elde etmek için papain, pronase ve pepsin gibi enzimlerle işlenir. Bu enzimatik işlemleri, kimyasal maddeye olan ihtiyacını azaltır, zaman ve enerji tasarrufu sağlar (Duran vd. 2007; Karmakar 1999).

2.11.4 Deri endüstrisi

Derinin geleneksel işleme yöntemleri, toksik kimyasalların kullanımı nedeniyle çevre için zararlıdır. Çevreyi kirlettiği için canlı organizmalar için tehlikeli kabul edilir. Bununla beraber derinin enzimatik işlenmesi kullanıldığında kimyasal işleme kaynaklı sorunlar başarıyla ve kolayca çözülebilir ayrıca deri işleme sürecinde enzimlerin uygulanmasıyla çevresel kirlilik azalırken, deri kalitesi de önemli ölçüde artmıştır. Derinin fibriller olmayan proteinlerinden kurtulmak ve derinin olmayan kollajen bileşenlerini parçalamak için başarıyla kullanılabilir. Alkalin proteazların kullanılması hızlı su emilimini sağladığı için sirkelenme süresini önemli ölçüde azaltabilir (Choudhary vd. 2004; Jaouadi vd. 2013). Ayrıca alkalin proteazların tür alma işlemi sırasında sodyum klorür ve kireç hidrat ile kullanılması endüstride atık bertarafını azaltır. Bu nedenle, enerji ve zaman tasarrufu yapmak, atık tehlikesini azaltmak ve deri kalitesini arttırmakla beraber çevre dostu işleme

katkıda bulunmak için alternatif proteazlarla yapılan deri işlemidir (Adrio ve Demain 2014; Zambare vd. 2011).

2.11.5 Kağıt ve fotoğraf endüstrisi

Kâğıt endüstrisinde makinalarda oluşan kalın biyofilm tabakalarını temizlemek için lipaz ve glikosidazlarla beraber proteazlar kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların birbirine yapışmasında ve canlı, cansız maddelere yapışmasında, mikroorganizmalar tarafından üretilen ekstraselüler polimerik maddeler rol oynamaktadır. Bu polimerik maddelere proteinden oluşmaktadır. Bu yüzden biyofilm temizliğinde en çok proteazlar kullanılır (Nahar vd. 2018).

Proteazlar ayrıca fotoğrafçılık sektörün de de kullanılır. Fotoğraf filmlerindeki jelatin tabakası %1.5-2 civarında gümüş içerir. Filmlerin yakılmasıyla yüzeydeki gümüş geri kazanılır. Ancak bu durum geri dönüşü olmayan çevresel kirliliğe yol açar. Jelatinle bağlı gümüş protein tabakası, proteolitik enzimlerle tedavi edilerek çıkarılabilir. Jelatinin enzimatik hidrolizi, sadece gümüş geri kazanımını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda poliester esaslı filmin tekrar kullanılabilir hale gelmesine olanak tanır (Gupta vd. 2002).

2.11.6 İlaç ve kozmetik endüstrisi

Alkali proteazlar, tıbbi önem taşıyan ürünlerin geliştirilmesinde kullanılır. Yanıklar, yatak yaraları, apseler ve derin enfeksiyonların tedavisinde kullanılırlar. Ayrıca enzim takviyeleri, vücutta birtakım gereksinimleri gidermek ya da enzim ihtiyacını karşılamak için üretilir. Sindirim sistemine destek sağlamak için de üretilen ilaçlarda proteazlar kullanılır (Kudrya ve Simonenko 1994; Kim vd. 1996). Kozmetik alanında günümüzde cilt bakımı, diş hijyeni, saç bakımı ve kontakt lens bakımında artan ihtiyaçlar nedeniyle enzim kullanımı hızla artmaktadır (Gerze 2003).

2.11.7 Atık endüstrisi

Enzimler sanayi ve evsel atık yönetiminde kullanılmaktadırlar. Bu atıklar, sadece tüm canlılar için değil, aynı zamanda çevre için de tehlikeli olmalarının yanı sıra içerdikleri toksik kimyasal maddelerle öne çıkarlar. Özellikle toksik olarak zararlı olan bu maddelerin zararsız hale dönüştürülmesi için enzimler (proteaz, lipaz, karbohidraz, oksidoredüktaz) kullanılır. Çoğunlukla mikrobiyal kaynaklı olan bu enzimler tek başına ya da birlikte kombine edilerek kullanılabilirler (Singh vd. 2016). Proteazlar sucul sistemlerde de kullanılmıştır. Burada kullanılan enzimler sistemdeki oksijen ihtiyacını azaltmak için kullanılmaktadır; bunu da protein içeren atıkları çözündürerek yapmaktadırlar. Kümes hayvanlarından elde edilen atık tüyler proteaz enzimleri ile muamele edilerek protein içeren yem katkı maddeleri elde edilmiştir (Gupta vd. 2002).

2.12 Türkiye'de Üretilen Küflü Peynirler

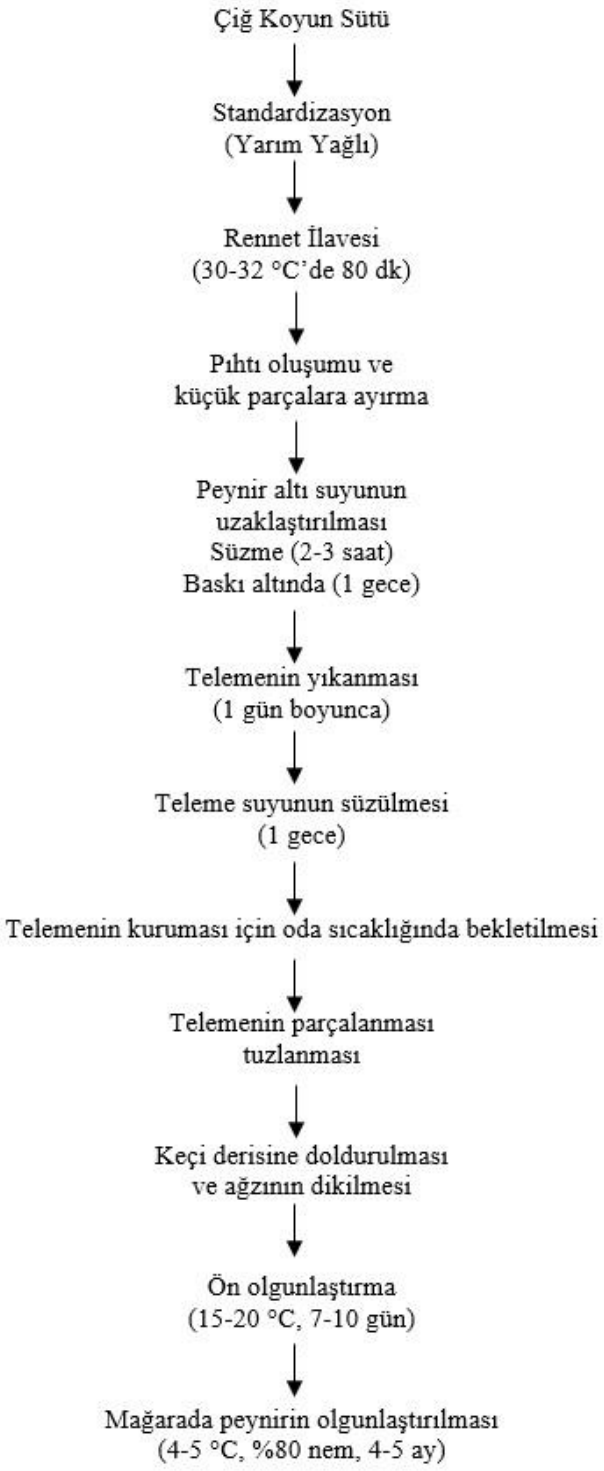
Türkiye'de çok çeşitli peynir türleri üretilmektedir. Endüstriyel olarak üretilen peynirlerin yanında çok çeşitli yöresel peynirler de üretilmektedir. Bu çeşitli peynirlerden biri de küflü peynirlerdir. Ancak bu yöresel peynirlerin üretiminde kalite ve standardizasyon konusunda sıkıntılar yaşanmaktadır. Her peynir farklı şekilde üretilmektedir. Bu çeşitlilik, farklı üretim teknikleri, kalite ve standart sağlanamaması gibi sebeplerden küflü peynirlerin üretimi için daha etkili yöntemlerin geliştirilmesi, eksiklerin giderilmesi bir gereklilik haline gelmiştir (Özgören ve Seçkin 2012).

Ülkemizde üretilen yöresel küflü peynirlere Divle Obruğu civarında "Divle Obruk Tulum Peyniri", "Konya Küflü Peyniri", Mersin ve civarına ait "Küflü Tulum Peyniri", Erzurum bölgesinde "Göğermiş Peyniri", Kayseri Çömlek Peyniri, Isparta Küflü Çömlek Peyniri,, Artvin ve Ardahan yöresine ait "Gorcolo Peyniri", Yusufeli Küflü Köy Peyniri, Doğu Anadolu bölgesinde "Tomas Peyniri", Konya Cihanbeyli Küflü Peyniri çeşitleri örnek verilebilir (Özgören ve Seçkin 2012; Hastaoğlu vd. 2021). Bu çalışmada Divle Obruk Peynirinde kullanılan küf suşları kullanıldığından bu peynir açıklanmıştır.

2.13 Divle Obruğu Tulum Peyniri

Divle Obruğu Tulum Peyniri çiğ, yarım yağlı koyun sütünden yapılan yarı sert bir peynirdir. Geleneksel olarak sütün en çok olduğu ilkbahar döneminde Karaman'da üretilir. Karaman'ın Ayrancı İlçesi Üçharman köyünde bulunan mağaralarda olgunlaştırılır. Divle mağarası dağların içinde büyük bir boşluktan oluşur ve 70 metre derinliktedir.

Peynirler geleneksel yöntemle başta starter kültür kullanılmadan üretilir. Mağarada 4 ay süresince keçi derisinden oluşan tulumlara basılarak olgunlaştırılır. Bu peynirin mağaradaki olgunlaşma sürecinden kaynaklanan kendine özgü özellikleri vardır. Bu süreçte sıcaklık 8-10 °C, nem ise %85-90 seviyelerindedir. Keçi derisi tulumları olgunlaşmanın başlangıcında mavi-yeşil renktedir. Olgunlaşmanın 60. gününden sonra kırmızı renge dönüşmektedir. Bunun sebebi peynir çevresinden ve mağaradan kaynaklanan mikroorganizmaların varlığıdır (Öztürkoğlu Budak 2016; Tekinşen ve Uçar 2007).



Şekil 2.2 Divle Obruğu Tulum Peyniri üretim akış şeması

2.14 Matematiksel Modelleme

Matematiksel modelleme, incelenen sistemin karmaşık ilişkilerini temsil eden bir yapıdır. Bu model, matematiksel denklemler, grafikler, tablolar veya neden-sonuç ilişkilerinin belirli bir düzenlenmesini içerebilir. Sistem biyoreaktör, hücre kültürü, enzim reaksiyonları gibi çeşitli operasyon birimleri olabilir. İlgi değişkenleri besleme hızı, sıcaklık, pH seviyesi, karıştırma hızı, inokulum kalitesi ve işletme maliyeti gibi faktörleri içerebilir. Bu matematiksel model, sistemin nasıl davranacağını anlamamıza yardımcı olur. Örneğin sıcaklığı arttırdığımızda ya da glikoz konsantrasyonunu azalttığımızda sistemde nasıl değişiklikler olacağını tahmin edebiliriz (Mavituna ve Sinclair 2008).

Çalışmamızda modelleme bağımsız değişken parametrelerinin değerlerini üç boyutlu grafik üzerinde görmemizi sağlamıştır ve değişken parametrelerinin birbirini nasıl etkilediklerini görmemize olanak tanımıştır. Bu sayede çalışmamızda her suş için 27 değişken parametresinden elde edilen proteaz enzimi aktivite değerlerini modelleme ile tek bir grafikte gözlenmiştir ve görsel olarak kolay anlaşılır bir grafik ortaya konulmuştur.

Çizelge 2.4 Modeli oluşturan değişkenler (Mavituna ve Sinclair 2008)

MODEL Çalışılan ilgi değişkenleri arasındaki ilişkiler kümesi
1- Durum Değişkenleri
2- Ara Değişkenler
3- Çalışılan Değişkenler
4- Kinetik Değişkenler
5- Sitokiyometrik Parametreler

Bu model aynı zamanda ekonomik açıdan önemli olan başa baş noktasını belirlemek gibi soruları da ele alabilir. Örneğin belirli çalışma koşulu altında işletmenin karlılığını sağlamak için gereken minimum üretim miktarını ve maliyetini hesaplayabiliriz. Modelleme bilim, mühendislik ve endüstri gibi birçok alanda kullanılır. Bu modeller, karmaşık sistemleri anlamamıza gelecekteki değişiklikleri tahmin ve optimize etmemize

yardımcı olur. Böylece daha verimli ve etkili çözümler üretebiliriz (Mavituna ve Sinclair 2008).

Mühendislik alanlarında enstrümantasyon, ölçüm, bilgi teknolojisi, moleküler biyoloji ve yüksek verimli tekniklerdeki gelişmeler sayesinde niceliksel ve niteliksel veri, bilgi miktarında büyük bir artış yaşanmaktadır. Bu verilerin anlam kazanabilmesi için aralarındaki ilişkileri ve bağlantıları bulmak gereklidir. Bu amaçla çeşitli yazılım araçları mevcuttur. Ancak bu ilişkileri ve bağlantıları kurmak ve anlamak basit bir süreç değildir. Bu ilişkiler döngüsel bir yapıya sahiptir. Be nedenle döngüyü başlatmak için sadece ver ve gözlemlerle başlamak yeterli olmayabilir. Başlangıç noktası olarak bir hipotezle başlamak gerekir. Daha sonra bu hipoteze dayalı basit bir model oluşturmak ve bu modele dayalı deneyler tasarlamak önemli bir adımdır. Bu hipotez ve modele dayalı deneyler hipotezin doğruluğunu test etmek, modelin tahmin yeteneklerini değerlendirmek için yapılır. Tahmin modellerinin sonuçları, deneysel sonuçlarla karşılaştırılarak test edilir. Bu süreç bilgiyi anlamlandırmak ve gelecekteki olayları öngörmek için önemli bir araçtır (Mavituna ve Sinclair 2008).

Bir mikroorganizmanın farklı suşları arasında performans karşılaştırması yapmak bu modellerin oluşturulması için önemli bir uygulamadır. Bu matematiksel modeller mikroorganizmaların belirli bir ortamda nasıl büyüdüklerini ve metabolize ettiklerini gösteren spesifik gelişim hızı ya da protein üretim oranı gibi niceliksel tanımlamalara dayanabilir. Bir model kullanılarak hücrelerin bir biyoreaktörde ne kadar hızlı gelişeceği tahmin edilebilir. Böylece uygun inokulum miktarı ve fermentasyon başlama zamanı belirlenebilir. Bu deneylerin daha etkili bir şekilde planlanmasına ve kaynakların daha verimli kullanılmasına yardımcı olabilir. Modeller aynı zamanda bilimsel iletişimde de önemli bir rol oynar. Model bazlı tanımlamalar farklı disiplinlerden bilim insanları ve mühendisler arasında iletişimi kolaylaştırır. Ayrıca bu modeller bazen göz ardı edilen veya düşünülmeyen faktörleri vurgular. Böylece daha kapsamlı ve doğru sonuçlara ulaşmak için yeni deneylerin yapılmasına olanak tanır (Mavituna ve Sinclair 2008).

Modellerin etkili bir şekilde kullanılabilmesi için döngüsel prosesler üzerinden özgün ve sağlam bir model oluşturulmalıdır. Mevcut hesaplamalı yazılımların uydurma

yaklaşımlarına eğilimli olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Ancak model oluşturma sürecinde basit polinom denklemlerine dayalı eğri oluşturma yerine fiziksel, kimyasal ve biyolojik ve anlamları olan denklemlerle ilişkilendirilmiş modeller oluşturulmalıdır. Ayrıca modelin doğruluğunu değerlendirmek için model parametrelerinin tahmin edilmesi önemlidir. Bu bağımsız bir deneme seti kullanılarak modelin gerçek dünyadaki başarısını test etme fırsatı sağlar. Deneme verilerinin analizi sırasında dikkate alınması gereken deneysel hatalar model doğrulama ve tahmininde kritik bir rol oynar. Modelleme sürecinde veri setinden yüksek derecede hata içeren verilerin çıkarılması gerekebilir. Bu nedenle denemelerin, örneklemelerin ve analizlerin dikkatlice planlaması ve çoğaltılması önemlidir. Gerçek dünyada negatif konsantrasyonların olmaması ve sistem değişkenleri ile parametrelerinin belirli teknik, biyolojik, kimyasal, fiziksel sınırlamalara tabi olması gibi kısıtlamaları unutmamak da önemlidir. Bu kısıtlamalar modelleme sürecinde dikkate alınmalıdır. Oluşturulan modeller bu gerçekliklere uygun hale getirilmelidir. Bu dikkatli ve sistematik yaklaşım modellemenin doğruluğunu arttırarak gerçek dünyadaki uygulamalarda daha güvenilir sonuç elde etmemize olanak tanır (Mavituna ve Sinclair 2008).

2.15 Proteaz Aktiviteleri ile Yapılan Daha Önceki Çalışmalar

Berikten ve Kıvanç (2021) yaptığı araştırma çalışmasında farklı küf türlerinin enzim üreticisi olarak en uygun olanlarını belirlemeye çalışmıştır. Çalışmasında *Humicola insolens, Lichtheimia corymbifera, Rhizomucor pussillus, Melanocarpus albomyces, Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus terreus* küf türlerini kullanmışlardır. En iyi proteaz üreticisi türünün *Aspergillus fumigatus* olduğunu tespit etmişlerdir.

Sayedi (2021) ısıya dirençli küflerin proteaz aktivitelerinin incelenmesi üzerine çalışma yapmıştır. *Penicillium* sp., *Talaromyces* sp., *Paecilomyces* sp., *Hamigera* ve *Aspergillus* sp. suşlarıyla yapılan çalışmada en yüksek proteaz üretme yeteneğinin *Penicillium* sp. suşlarının olduğunu tespit etmiştir. Sırasıyla proteaz enzimi üretme yetenekleri yüksekten düşüğe *Penicillium janczewskii, Penicillium* sp., *Penicillium turbarum* ve *Penicillium turbatum* suşları olduğunu ortaya koymuştur.

Ozturkoğlu-Budak vd. (2016b) Divle Obruk peynirinden izole ettiği mikroorganizma suşları ile yaptığı çalışmada çeşitli mikroorganizmaların (maya, küf ve bakteri) proteaz aktivitelerini araştırmıştır. Skim-milk agar besiyerinde yaptığı araştırmada en iyi proteaz aktivitelerini küflerde gözlemiştir. Küf suşlarını 10 gün, pH 5, 15 °C'de inkübe etmiştir. 16 farklı küf türünde en yüksek proteaz aktivitesini sırasıyla *Penicillium brevicompactum* (14.19 U/mg), *Penicillium corylophilum* (13.44 U/mg), *Penicillium chrysogenum* (11.85 U/mg), *Penicillium polonicum* ve *Penicillium cavernicola* suşlarında tespit etmiştir. Bu suşlardan elde edilen enzimler peynir endüstrisinde kullanılmak üzere saflaştırılarak kullanılabileceği sonucuna varmıştır.

Özkan (2010) bazı küf türleriyle, küflerin en iyi proteaz aktivitesini sağladığı koşulları bulmayı amaçlamıştır. Yaptığı çalışmada *Penicillium chrysogenum, Penicillium piceum, Trichothecium roseum ve Aspergillus wentii ve* küf türlerini kullanmıştır. Bu türler arasında *Trichothecium roseum*'un en yüksek proteaz aktivitesine sahip olduğu bundan sonraki en yüksek aktivitenin ise *Penicillium chrysogenum* suşuna ait olduğunu belirlemiştir. Yapılan optimizasyon çalışmasında 280 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri sonucunda optimum koşulların 40 °C'de pH 6.5 ve 10 dakika inkübasyon süresi olduğunu tespit etmiştir.

Korcan vd. (2007) yaptığı çalışmada *Aspergillus, Alternaria, Cladosporium, Penicillium* cinsi küflerin enzim üretme yeteneklerini incelemişlerdir. 390 farklı *Penicillium* kültüründen 135 kültürün proteaz ürettiğini gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçta bu küflerden sadece *Penicillium* cinsi olanların proteaz üretme yeteneklerinin en yüksek olduğunu değerlendirmişlerdir.

De Vries vd. (2004) *Aspergillus* cinsi küflerle protein üretimi ile ilgili çalışma yapmış ve yaptığı çalışmada proteaz aktivitelerini tespit etmiştir. En yüksek proteaz aktivitesi *Aspergillus niger* CBS 120.49, *Aspergillus vadensis* CBS 113365, *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92 suşları için pH 4'te; *Aspergillus foetidus* CBS 115.52, *Aspergillus japonicus* CBS 114.51, *Aspergillus sojae* ATCC 20387 suşları için pH 6; *Aspergillus oryzae* ATCC 20836 suşu için pH 8 olduğunu tespit etmiştir.

Güldiken (2022) endüstriyel alanda yerli proteaz çeşitliliğini arttırmak için çalışma yapmıştır. *Pseudoxanthomanas taiwanensis, Tepidomomas sp., Bacillus subtilis, Bacillus sp.* ve *Brevibacillus borstelensis* mikroorganizma türleriyle proteaz aktivitelerini tespit etmiştir. Yaptığı çalışmada 660 nm dalga boyunda ölçülen absorbansları sonucu hesaplanan en yüksek proteaz aktivitesinin *Brevibacillus borstelensis* türünde 50 °C ve pH 12'de olduğunu tespit etmiştir.

Asar (2016) yaptığı araştırmada *Bacilllus mageterium* türü bakteriyle proteaz aktivitelerini deterjan endüstrisinde kullanımının iyileştirilmesini amaçlamıştır. Yaptığım çalışmayla benzer olarak bu çalışmada da yağsız süt tozu besi yeri kullanarak zamana bağlı en yüksek proteaz aktivitesini 72. saatte tespit etmiştir. 660 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ile maksimum aktivite pH 8 ve 30 °C'de bulmuştur.

Demir (2020) yaptığı çalışmada *Bacillus* sp. EBTA6 izolatını seçerek endüstri alanında proteaz üretici olması için koşulları araştırmıştır ve modellemesini yapmıştır. Optimizasyon sonucu 600 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri sonucu optimum proteaz üretiminin 30 °C pH 9 ve 15 g/L maya özütü konsantrasyonunda olduğunu tespit etmiştir.

Temel (2015) yaptığı çalışmada *Bacillus* sp. P22 yerel izolatını kullanarak alkalen proteaz üretiminin optimum koşullarını araştırmayı amaçlamıştır. Yaptığı çalışmalar sonucu proteazın optimum çalışma sıcaklığının 40 °C ve pH 10.5 olduğunu belirlemiştir.

Ayvazoğlu (2023) yaptığı çalışmada *Bacillus* sp. G17 suşunu kullanarak yerli proteaz üretimine katkıda bulunmayı amaçlamıştır. Skimmed Milk Agar besiyerinde 37 °C'de 48 saat inkübe ederek proteaz üretmiştir. 440 nm dalga boyunda ölçülen proteazın en yüksek aktivitesini 50 °C ve pH 8'de tespit etmiştir.

Erdoğan (2020) yaptığı çalışmada *Bacillus subtilis megatherium* bakterisinden proteaz enziminin saflaştırılmasını ve özelliklerinin belirlenmesini amaçlamıştır. 275 nm dalga

boyunda elde ettiği sonuçlara göre optimum enzim aktivitesinin 60 °C ve pH 8.97'de olduğunu tespit etmiştir.

Değirmen (2019) çalışmasında *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun proteaz aktivitesini inceleyerek optimum koşullarını tespit etmeyi amaçlamıştır. UV-VIS spektrofotometrede 280, 600 nm dalga boyunda ölçülen proteaz enzim aktivitesinin en iyi koşullarının 60 °C ve pH 8'de olduğunu tespit etmiştir.

Tolan (2015) *Bacillus sp. MT01* suşu ile yaptığı çalışmada hücre dışı proteaz enzim aktivitesi optimum koşullarını araştırmıştır. 280 nm dalga boyunda ölçtüğü absorbans ile elde ettiği sonuçta maksimum enzim üretim zamanının 50 °C ve pH'sının ise 7.5 olduğunu tespit etmiştir.

Bdewe (2020) yaptığı çalışmada *Bacillus* cinsi bakterilerden *Bacillus cereus* bakteri türünü kullanmıştır. Proteaz üretiminin en iyi inkübasyon süresinin 24 saat olduğunu belirlemiştir. 280 nm dalga boyunda ölçülen proteaz aktivitesinin optimum sıcaklığının 37 °C ve pH'nın ise 8.5 olduğunu tespit etmiştir.

Gerze (2003) yaptığı çalışmada *Bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus polymxa* bakterilerini kullanmıştır. 275 nm dalga boyunda ölçtüğü absorbans değerleriyle elde ettiği sonuçlarda optimum proteaz aktivitesini *Bacillus subtilis megatherium* suşu için pH 9.14, *Bacillus polymxa* için pH 7.02 olarak belirlemiştir. Maksimum aktivite değeri her iki suş için 60 °C olduğunu tespit etmiştir.

Sevinç (2010) yaptığı çalışmada izole ettiği *Bacillus sp.* suşlarının bazı faktörlerin proteaz aktivitesine etkisini araştırmıştır. 546 nm dalga boyunda absorbans değerlerini belirlemiştir. Belirlediği değerlere göre optimum proteaz aktivitesini 55 °C'de, pH değerini ise 7 olarak tespit etmiştir.

Güngör (2011) *Bacillus* suşlarına ait proteaz enzimin optimizasyonu ile ilgili araştırma yapmıştır. 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değerlerini ölçmüştür.

Yaptığı çalışma sonucunda belirtilen suşta optimum sıcaklığın 60 °C ve optimum pH'nın ise 10 olduğunu tespit etmiştir.

Özden (2014) yaptığı çalışmada *Bacillus subtilis* RSKK-11014 suşundan elde edilen proteazın aktivitesinin çeşitli koşullarda değişimini ve optimum aktivite değerlerini hesaplamayı amaçlamıştır. 660 nm dalga boyunda okunan değerlere göre en yüksek enzim aktivitesinin 50 °C'de, pH değerinin 9.5 olduğunu bulmuştur.

Güven Gülhan (2014) yaptığı çalışmada izole ettiği *Bacillus sp.* suşunun çeşitli enzim aktivite değerlerini hesaplamıştır. Bunların içinden proteaz enzim aktivitesi için 280 nm dalga boyunda okuma yapmıştır. Optimum proteaz aktivite değeri 25 °C, pH değerinin ise 6 olduğunu tespit etmiştir.

Karaman (2023) yaptığı çalışmada bakteri türlerinden *Geobacillus thermoleovorans* HBB208 kullanmıştır. Bu suşun üretimi, saflaştırması ve proteaz aktivitesi üzerine yaptığı araştırmada 660 nm dalga boyunda absorbans okuması yapmıştır. Elde ettiği verilerden optimum sıcaklığı 70 °C ve pH 8 olduğunu tespit etmiştir.

Görmez ve Gülmüş (2018) yaptıkları çalışmada *Bacillus pumilus* NK14 bakteri izolatının leke çıkarıcı olarak kullanılması için proteaz aktivitesinin araştırılmasını amaçlamışlardır. Araştırmalarında 660 nm dalga boyunda elde ettikleri absorbans değerlerine göre optimum sıcaklığının 50 °C ve pH 10'da olduğunu gözlemlemişlerdir.

Balachandran vd. (2021) yaptıkları çalışmada *Bacillus halodurans* suşunun bazı faktörlerin proteaz aktivitesine etkilerini araştırmışlardır. 660 nm dalga boyunda absorbans değerlerini ölçmüşlerdir. 48 saat inkübasyon sonucunda maksimum proteaz aktvitesinin 30 °C ve pH 9'da olduğunu göstermişlerdir.

Adetunji ve Olaniran (2020) araştımalarında *Bacillus aryabhattai* Ab15-ES suşunun çeşitli koşullarda proteaz aktivitelerinin optimizasyonu ve modellemesiyle ilgili çalışma

yapmışlardır. En yüksek proteaz aktivitesini sığır özütü, maltoz içeren koşullarda 40 °C' de ve pH 7.8'de olduğunu tespit etmişlerdir.

Pant vd. (2014) *Bacillus subtilis* suşunun optimizasyon çalışmalarını yapmışlardır. 650 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunan değerler kullanmışlardır. Maksimum proteaz aktivitesinin 40-50 °C'de ve pH 7.4'de olduğunu bulmuşlardır.

Özcan ve Çorbacı (2017) yaptığı çalışmalarda *Streptomyces* sp. K22 ve K30 suşlarının proteaz üretimleri ve aktivitelerini incelemişlerdir. Spektrofotometrede 655 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerinden hesaplayarak en yüksek proteaz aktivitesi *Streptomyces* sp. K22 ve K30 suşları için 20 °C'de; *Streptomyces* sp. K22 suşu için pH 6, *Streptomyces* sp. K30 suşu için pH 7'de olduğunu gözlemlemişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çiğ süt

Divle Obruğu Tulum Peyniri üretimi için Ankara Üniversitesi Süt İşletmesinden çiğ inek sütü ve Konya İli Kulu İlçesinden temin edilen çiğ koyun sütü kullanılmıştır.

3.1.2 Peynir mayası (Rennet)

Divle Obruğu Tulum Peyniri üretiminde kullanmak üzere dana şirdeninden elde edilmiş ve Ankara Üniversitesi Süt İşletmesinden temin edilen Rennet enzimi 1:16000 kuvvetindeki %100 dana şirdeni, Naturen, Chr Hansen, Türkiye) kullanılmıştır.

3.1.3 Küfler

Kullanılan küf suşları önceki çalışmalarımızla geleneksel Divle Obruğu Tulum Peynirinden izole edilerek moleküler yöntemler ile tanımlanan ve Ankara Üniversitesi Süt Teknolojisi Bölümü -20 °C stoklanan saf küf suşlarıdır (Ozturkoglu-Budak 2016a). Kullanılan küf suşları; *Penicillium brevicompactum, Penicillium chrysogenum, Penicillium cavernicola* ve *Penicillium corylophilum*'dur.

3.1.4 Besiyerleri

Küf suşları Malt Extract Agar **(**MEA**)** besiyerinde geliştirilmiştir. Hazırlama prospektüsüne göre uygun oranlarda çözdürülen besiyeri 121 °C'de 15 dk sterilizasyon işlemine tabi tutulmuş ve dökme sıcaklığına ulaştığında yayma plak yöntemi ile küf geliştirmek için petri kaplarına dökülmüştür.

3.1.5 Kimyasallar ve çözeltiler

Tartarik Asit Çözeltisi (%10): Petri kaplarında kullanılan peynirde pH ayarı yapmak için kullanılmıştır. pH düşürmek için tartarik asit çözeltisi kullanılmıştır. 10 g tartarik asit tartılmış ve 100 ml saf su içinde manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür.

Sodyum Hidroksit Çözeltisi (NaOH, 2N): Petri kaplarında kullanılan peynirde pH ayarı yapmak için kullanılmıştır. pH yükseltmek için sodyum hidroksit çözeltisi kullanılmıştır 8 g NaOH tartılıp 100 ml distile su içinde manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür.

Hidroklorik Asit Çözeltisi (HCL, 2N): pH ayarı yapmak için kullanılmıştır. %37 konsantrasyona sahip HCl'den 16.7 ml alınmış distile su ile balon jojede 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Trikloroasetik Asit (%10): Reaksiyonu durdurmak ve proteinleri çöktürmek için proteaz enzim aktivitesi tayininde kullanılmıştır. 100 g TCA bir miktar saf su ile manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. Balon jojede 1000 ml hacme tamamlanmıştır.

Trizma Base-Hidroklorik Asit Tampon Çözeltisi (100 mM pH 8 Tris-HCl): 12.11 g Trisma Base tartılmıştır. Manyetik karıştırıcıda bir miktar saf su ile çözdürülmüştür. HCl ile pH 8'e ayarlanmıştır. Distile su ile balon jojede 1000 ml hacme tamamlanmıştır.

Tirozin Stok Çözeltisi: Tirozin standart eğrisi grafiği çizmek için hazırlanmıştır. 9.06 mg tirozin tartılmıştır. 50 ml 1 mM pH 8 Tris-HCl tamponunda manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür.

Kazein Çözeltisi (%1): Kazein çözeltisi proteaz aktivite tayininde substrat olarak kullanılmıştır. Günlük olarak hazırlanmıştır ve buzdolabında saklanmıştır. 1 g sodyum kazeinat tartılmıştır. Su banyosunda 80 °C'de 1 mM 100 ml pH 8 Tris-HCl tamponu içerisinde çözdürülmüştür. Manyetik karıştırıcıda çözünmesi hızlandırılmıştır. Çözündükten sonra filtre kağıdında süzülmüştür.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (%7 Na_2CO_3): 7 g sodyum karbonat tartılmıştır. Manyetik karıştırıcıda 100 ml saf suda çözdürülmüştür.

Folin Reaktifi Çözeltisi (1 N): Proteaz enzimi aktivitesi ölçümünde reaktif olarak kullanılmıştır. 3 kat seyreltme yapılmıştır. 10 ml Folin-ciocalteu'sphenol reaktifi 20 ml saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Akrilamid-bisakrilamid Stok Çözeltisi (%30): 9.7 g akrilamid ve 0.27 g bisakrilamid hassas terazide tartılmıştır. 33 ml saf suda manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür.

Ayırma Jeli Tampon Çözeltisi: 9.075 g Tris tartılmıştır. 25 ml saf suda manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. HCl ile pH 8.8'e ayarlanmıştır. Distile su ile hacmi 50 ml'ye tamamlanmıştır.

Yükleme Jeli Tampon Çözeltisi: 3 g Tris tartılmıştır. 20 ml saf suda manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. HCl ile pH 6.8'e ayarlanmıştır. Saf su ile hacmi 50 ml'ye tamamlanmıştır.

Elektrot Tampon Çözeltisi: 8 g Tris, 36 g glisin ve 2.5 g sodyum dodesil sülfat tartılmıştır. Manyetik karıştırıcıda hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti kullanılmadan önce 5 kat seyreltilmiştir.

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (%10): 1 g sodyum dodesil sülfat tartılmıştır. 10 ml saf suda manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. SDS haftalık olarak hazırlanmıştır.

Amonyum Persülfat (APS) (%10): 1 g amonyum persülfat 10 ml saf suda manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. APS günlük olarak hazırlanmıştır.

3.2 Yöntem

Çalışmada öncelikle Divle Obruğu Tulum peyniri üretilmiş ve taze olarak küflerin geliştirildiği besi ortamı olarak kullanılmıştır. Küflerin peynir besi ortamında proteaz enzim üretimini değerlendirmek için peynirin üretildiği mağara koşulları göz önünde bulundurularak parametreler seçilmiştir. Bu düşünceden yola çıkılarak pH, sıcaklık ve süre olmak üzere üç parametre seçilmiştir. Her bir parametre için 3 değer seçilmiştir: pH 4.7, 5.0, 5.3; sıcaklık 15, 20, 25 °C; ve süre 7, 11, 14 gün. Tüm parametrelerin birbirine olan etkilerini incelemek amacıyla, parametrelerin birbirleri ile kombinasyonlarından 108 adet besi ortamı elde edilmiştir.

Küf suşlarının canlandırması yapılarak peynir besi ortamında proteaz enzim üretimi incelenmiş, 3 parametreden elde edilen değerler karşılaştırılmış ve optimum koşulları tespit edilmiştir. Tespit edilen optimum koşullar daha net olarak anlaşılması için matematiksel modelleme ile üç boyutlu grafikleri çizilmiştir. Ayrıca protein molekül ağırlıklarını tespit etmek ve enzim aktivite değerleriyle karşılaştırmak amacıyla SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır.

3.2.1 Peynir üretimi

Kullanılacak peynir Divle Obruğu Tulum Peyniridir ve %50 inek, %50 koyun sütü karıştıırılarak üretilmiştir. Peynir küf suşlarından proteaz enzimi elde etmek için besiortamı olarak olgunlaştırılmadan taze olarak kullanılmıştır. Üretim aşamaları Şekil 3.1'de şematik olarak gösterilmiş olup, aşağıda ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır.

İlk olarak çiğ inek sütü ve çiğ koyun sütlerinin eşit oranda olmak üzere 4 l inek sütü ve 4 l koyun sütü karıştırılmış, 30 °C'ye ayarlı su banyosunda bekletilmiştir. Mayalama sıcaklığına getirilen sütlere rennet enzimi ilave edilmiştir (1 ml rennet: 10 ml saf su ile karıştırılarak). Pıhtılaşmanın oluşması için oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir ve ardından pıhtı kesilmiştir. Yaklaşık 5-10 dakika bekledikten sonra teleme tülbent yardımıyla süzülmüştür ve 1 gece taş ile baskı altında süzülerek peynir altı suyunun

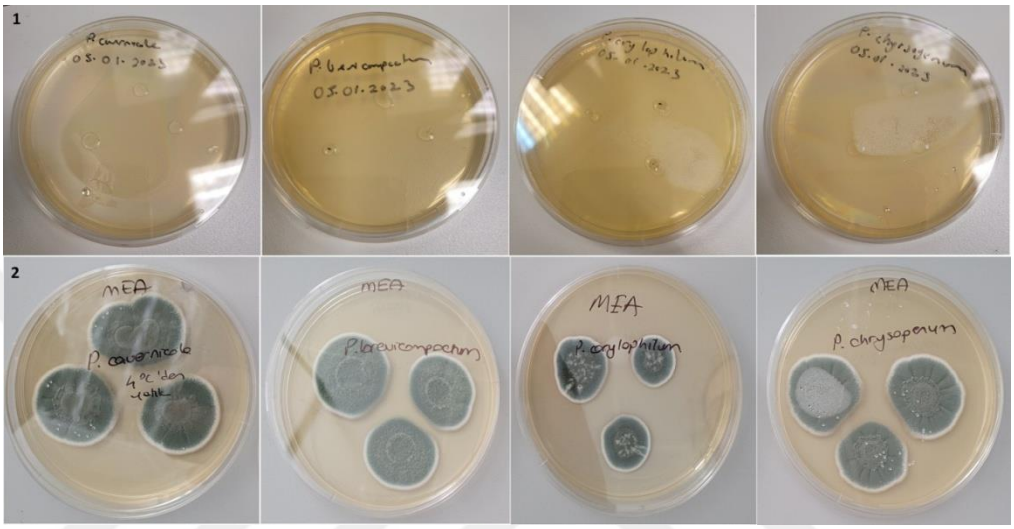
ayrılması sağlanmıştır. Peynir altı suyundan ayrılan telemenin pH değeri 5.9 olduğunda %2 tuz eklenmiş ve el ile yoğurup ufalayarak parçalanmıştır. Parçalama işlemine tabi tutulan teleme tulum peyniri kıvamı aldıktan sonra önceden delik açılmış peynir kaplarına basılmıştır. Altına kurutma kağıdı koyulan peynir kapları kalan suyunu da kaybettikten sonra poşetlenerek derin dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 3.1 Taze Divle Obruğu Tulumu üretim akış şeması

3.2.2 Stok kültürleri aktivasyonu

Derin dondurucudan (-20 °C) alınan stok kültürlerinin aktivasyonu MEA besiyerinde üç nokta tekniğine göre yapılmış ve 28 °C'de 5 gün boyunca aerobik inkübasyona tabi tutulmuştur.



Şekil 3.2 Stok kültürleri canlandırma (1: İnkübasyonun ilk günü, 2: İnkübasyonun 5. günü)

3.2.3 Hemositometre yöntemi ile küf sayımı

Aktive edilen stok kültürlerin spor sayısının tespit edilmesi için Hemositometre (Thoma Lamı, Burker-Turk, Brand, Germany) kullanılmıştır. Gelişen küflerin bulunduğu MEA içeren petri kaplarındaki sporlar 10 ml steril saf su ilavesi sonrası nazikçe kazınarak toplanmış ve steril falkon tüpe aktarılmıştır. Vortekslenen spor süspansiyonlarının sayımının yapılabilmesi için seyreltme işlemi yapılmıştır (yaklaşık 100 kat).

Seyreltme yapılan küf suşlarından 10 µl alınarak thoma lamının (hemositometre) her iki yanına damlatılmış ve 40x büyütme merceği ile mikroskop altında sayım yapılmıştır. Sayımlarda thoma lamında bulunan 16 küçük kare içinde ve çizgi üstünde bulunan küf sporları sayılmıştır. Toplamda 10 farklı sayım yapılmıştır ve sayımların ortalaması alınmıştır. Aşağıda belirtilen formül ile spor/ml miktarı tespit edilmiştir.

$$Mililitredeki\ Spor\ Sayısı\ \left(\frac{spor}{ml}\right) = A \times SF \times 2.5 \times 10^5$$

A: Sayım Ortalaması
SF: Seyreltme Faktörü

Bu formülden elde edilen sonuçlara göre küf suşlarında $1x10^8$ spor/ml olacak şekilde seyreltme yapılmıştır. Seyreltmeleri yapılmış küf suşlarımız süpernatant elde etmek için hazır hale getirilmiştir. İnokülasyon yapılacak peynirler hazırlanana kadar küf suşları buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.4 Peynir besi ortamı hazırlığı

Besiortamı farklı küf suşlarının peynir besiyerinde protein, aminoasit, süt yağı gibi bileşimlerin varlığında proteaz enzim üretim durumunu değerlendirmek ve Divle Obruğu Tulum Peynirinin doğal ortamını taklit ederek gerçekçi veriler elde etmek için hazırlanmıştır. Toplamda 2 tekerrür olmak üzere her bir tekerrür için 117 adet petri hazırlığı yapılmıştır. Kullanılan 4 farklı küf suşu ve parametrelerin (pH, T ve t) kombinasyonları hesaplanarak bu sayı elde edilmiştir. Divle Obruğu Tulum Peyniri şeklinde üretilen ve olgunlaştırılmadan buzdolabında saklanan peynir gama ışınları yardımıyla (10 kG) Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde 8 saat IR radyasyona tabi tutularak sterilize edilmiştir.

Peynirin kıvamını akışkan hale getirmek ve petri kutusunda besiortamı olarak kullanabilmek için oransal olarak 5 g peynir için 15 ml steril saf su laboratuvar tipi blender ile karıştırılarak (2 dk) homojen besiortamı hazırlanmıştır. Her bir petri için 20 ml peynir ve steril saf su karışımı kullanılmıştır. Peynir ve steril saf su karışımı homojenize edildikten sonra pH parametresi olarak 4.7, 5.0 ve 5.3 olmak üzere 3 değerde pH ayarı yapılmıştır. Besiortamının pH ayarı yapmak için 1 M HCI ve 1 M NaOH kullanılmıştır. pH'ları ayarlanan peynir karışımları steril kabin içerisinde petri kaplarına dökülmüştür.

3.2.5 Küflerin inokülasyonu

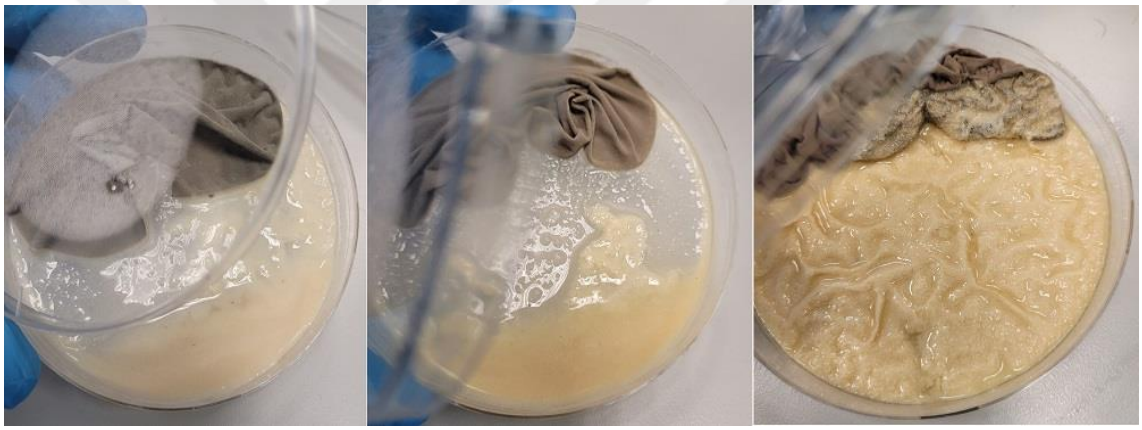
Spor sayısı $1x10^8$ spor/ml olacak şekilde ayarlanan her bir küf suşu her bir petri kabı içerisinde hazırlanan peynir besi ortamına 100 µl olarak inoküle edilmiştir. Peynir besi ortamında küflerin gelişimi için ve proteaz enzim üretimlerinin değerlendirilmesi için farklı sıcaklık parametreleri olarak seçilen 15, 20 ve 25 °C sıcaklıklara inkübasyona tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.1 Küf suşlarının pH, T ve t parametreleri kombinasyonu

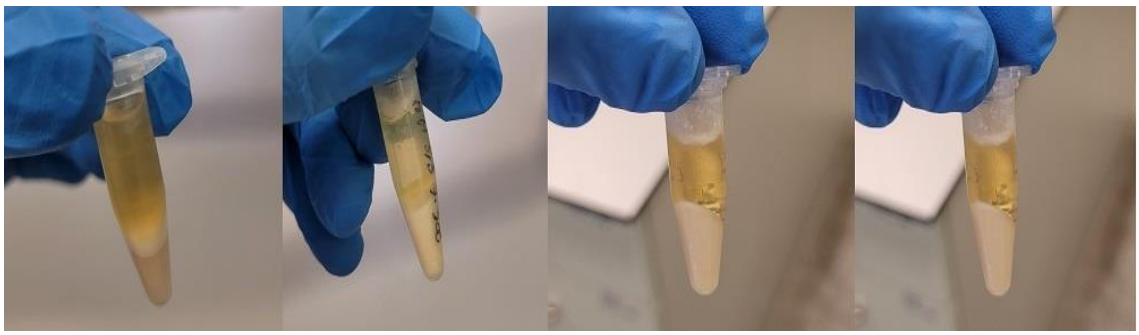
	KÜF SUŞLARI	pH	T	t
1	*P. brevicompactum, P. cavernicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	4.7	15	7
2	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	4.7	20	7
3	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	4.7	25	7
4	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.0	15	7
5	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.0	20	7
6	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.0	25	7
7	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.3	15	7
8	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.3	20	7
9	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.3	25	7
10	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	4.7	15	11
11	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	4.7	20	11
12	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	4.7	25	11
13	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.0	15	11
14	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.0	20	11
15	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.0	25	11
16	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.3	15	11
17	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.3	20	11
18	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.3	25	11
19	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	4.7	15	14
20	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	4.7	20	14
21	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	4.7	25	14
22	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.0	15	14
23	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.0	20	14
24	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.0	25	14
25	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.3	15	14
26	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.3	20	14
27	*P. brevicompactum, P. cavenicola, P. chrysogenum, P. corylophilum*	5.3	25	14

3.2.6 Süpernatant eldesi

Proteaz enzim aktivitesini belirlemek için, gelişmeye bırakılan petrilerden süpernatant elde edilmiştir. Süpernatant elde etmek için küf suşları farklı süre parametreleri olarak seçilen 7, 11 ve 14 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Kullanılacak olan tüm malzemeler otoklavda steril edilmiştir. Petrilerin üstte oluşan küf tabakası spatula yardımıyla kaldırılmış ve altta biriken serum kısmı hafif eğik tutulan petrilerden otomatik pipet yardımıyla çekilmiştir. Çekilen sıvı kısımlar eppendorf tüplere aktarılarak santrifüj cihazında (Allsheng, Mini-15K, Çin) 14.000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüjleme sonrası elde edilen üst faz proteaz enzim aktivitesi tayininde kullanılmak üzere -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 3.3 İnkübasyon sonrası petrilerde oluşan sıvı kısım



Şekil 3.4 Santrifüjleme sonrası süpernatant görüntüleri

3.2.7 Tirozin standart eğrisi grafiği

Gülmüş ve Görmez (2018), Tolan (2007) ve Prakasham vd. (2006) tarafından kullanılan yöntemler modifiye edilmiştir. Proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için öncelikle tirozin standart grafiği oluşturulmuştur. 50 ml 1 mM Tris-HCl (pH 8) tampon çözeltisinde 9.06 mg tirozin çözdürülerek 0.180 mg/ml olacak tirozin ana stok çözeltisi elde edilmiştir. Hazırlanan ana stok çözeltisinden alınıp belli hacimlere seyreltilerek kalibrasyon çözeltileri elde edilmiştir. Kalibrasyon çözeltileri 0.018, 0.036, 0.054, 0.072, 0.108, 0.144, 0.180 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

Seyreltme işlemleri yapılan ana stok çözeltilerden 0.2 ml alınmış ve üzerine 2 ml %10'luk TCA eklenerek 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Stok çözeltiler santrifüj (Sigma, 3-18K, Almanya) cihazında 9000 rpm'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Hızlı bir şekilde 0.5 ml stok çözeltiden alınarak üzerine 2.5 ml %7'lik Na_2CO_3ve 0.5 ml 1 N folin çözeltisi eklenmiştir. Stok çözeltiler karanlıkta 30 dk bekletilmiştir. Küvetlere konularak 1 mM pH 8 Tris-HCl şahide karşı UV-VIS spektrofotometrede (Perkin Elmer, Lambda 25, Amerika Birleşik Devletleri) 660 nm dalga boyunda absorbans okuma yapılmıştır. Absorbans değerleriyle tirozin standart grafiği çizilmiştir (Şekil 3.5). Tirozin standart grafiğinden elde edilen eğimle aşağıda belirtilen denklemi kullanılarak proteaz enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

$$Enzim\ Aktivitesi\left(\frac{U}{ml.dk}\right) = \frac{A \times B}{C \times D} \times SF$$

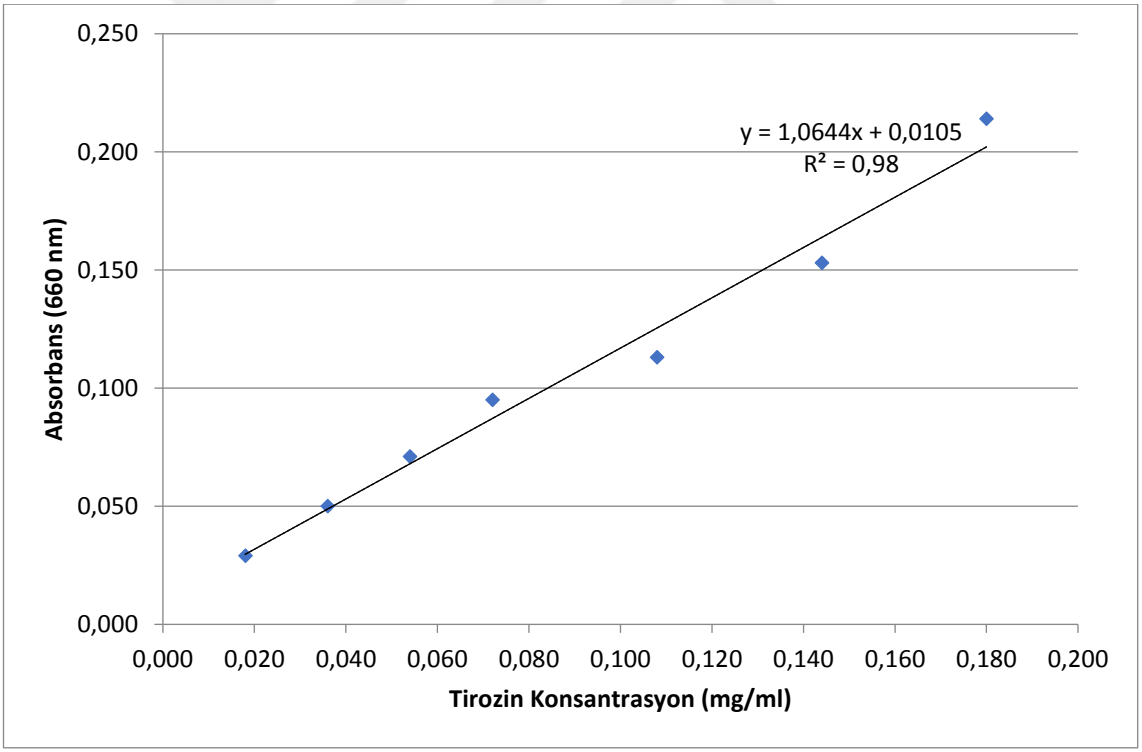
A: Eğriden bulunan değer (mg/ml)
B: Toplam hacim (0.2 ml süpernatant + 1 ml kazein + 2 ml TCA)
C: Enzim miktarı (ml)
D: İnkübasyon süresi (dk)
SF: Seyretme Faktörü

Bir Ünite enzim aktivitesi (U/ml): Reakksiyon koşullarında bir dakikada bir mg tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.2 Tirozin ana stok çözeltisi seyreltme

Seyreltme Hedefi (mg/ml)	Tirozin Ana Stok Çözeltisi (µl)	1 mM Tris-HCl (pH 8) Tamponu (µl)
0,180	1000	0
0,144	800	200
0,108	600	400
0,072	400	600
0,054	300	700
0,036	200	800
0,018	100	900
Şahit	0	1000

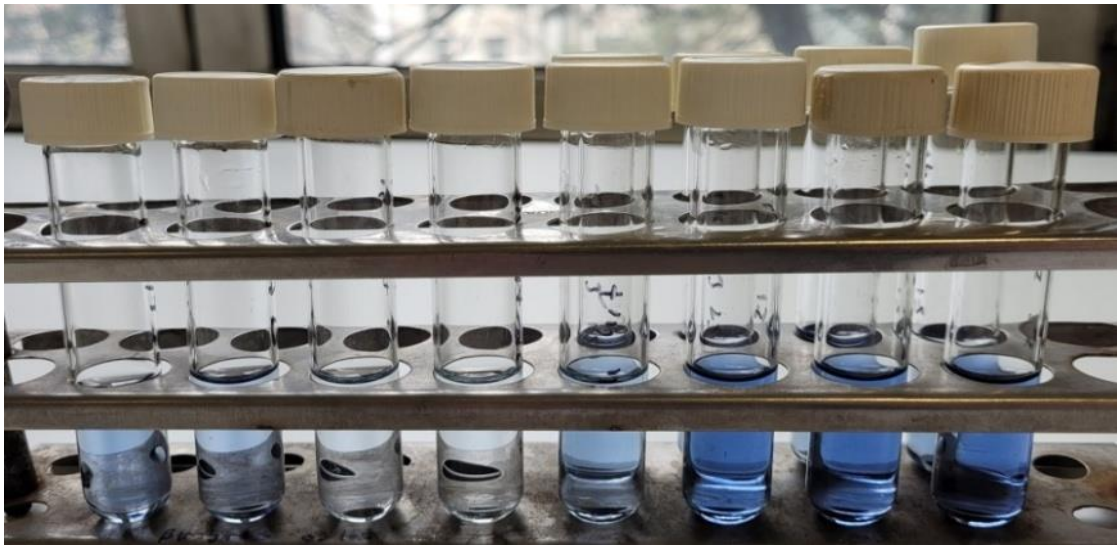
Proteaz enzim aktivitelerinin saptanması için oluşturulan tirozin standart eğrisi Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Enzim aktiviteleri eğimden elde edilen formül ile bulunmuştur.



Şekil 3.5 Tirozin standart eğrisi

3.2.8 Proteaz enzim aktivitesi belirlenmesi

Enzim aktivitelerinin belirlenmesi için Gülmüş ve Görmez (2018), Tolan (2007) ve Prakasham vd. (2006) tarafından kullanılan yöntemler modifiye edilerek kullanılmıştır. Falkon tüp içerisine her bir küfün peynir besi ortamında geliştirilmesi sonucu elde edilen süpernatanttan 0.2 ml alınmış ve üzerine substrat olarak kullanılan 1 ml kazein çözeltisi (%1 kazein 1 mM pH 8 Tris-HCl) eklenerek vortekslenmiştir. Karışım ortamdaki tirozinin serbest kalması için inkübasyona 37 °C'de 15 dk su banyosunda bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra reaksiyonu durdurmak ve proteinleri çöktürmek için içine 2 ml %10'luk TCA eklenip vorteklenmiş ve santrifüj cihazında 9000 rpm'de 4 °C' de 15 dk santrifüjlenmiştir. Şahit örnek için süpernatant yerine 0.2 ml,1 mM pH 8 Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. Falkon tüpe 0.5 ml TCA eklenip santrifüjleme ile elde edilen üst faz eklenmiştir. Bundan sonraki işlemler hızlı bir şekilde yapılmıştır ve 2.5 ml %7'lik sodyum karbonat ve 0.5 ml 1 N folin üzerine eklenerek vortekslenmiştir. Karanlık odada 30 dakika bekletilmiş ve süre sonunda alınan falkon tüplerde 5 kat (4 ml 1 mM pH 8 Tris-HCl ve 1 ml sodyum karbonat ve folin eklenen son karışım) seyreltme yapılmıştır. Seyreltme işleminden sonra UV-VIS spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda kuvartz küvetlerde absorbans okuma yapılmıştır.



Şekil 3.6 Örneklerde gözlenen renk değişimi

3.2.9 Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) analizi

Laemmli (1970) tarafından uygulanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Analiz için her bir suşun en yüksek proteaz enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenen 8 adet süpernatant (*P. brevicompactum* pH 4.7, 25°C, 14 gün; *P. cavenicola* pH 5.0, 20 °C, 14 gün; *P. chrysogenum* pH 5.0, 25 °C, 14 gün; *P. corylophilum* pH 5.0, 25 °C, 14 gün; *P. brevicompactum* pH 4.7, 20 °C, 14 gün; *P. cavenicola* pH 5.0, 15 °C, 14 gün; *P. chrysogenum* pH 5.0, 20 °C, 14 gün; *P. corylophilum* pH 5.0, 25 °C, 11 gün) seçilmiştir ve SDS-PAGE analizine tabi tutulmuştur. Ayırma jeli ve yükleme olmak üzere iki adet jel hazırlanmıştır. Yürütme yapılacak olan cam malzemeler saf su ve alkol ile iyice temizlenmiştir. Ayırma jeli (%12) hazırlamak için kullanılan çözeltiler aşağıda gösterilmiştir:

Akrilamid-bisakrilamid stok çözeltisi (%30)	4 ml
Ayırma jeli tampon çözeltisi (Tris pH 8.8)	2.6 ml
SDS stok çözeltisi (%10)	100 µl
Saf su	3.2 ml
Amonyum persülfat (APS %10)	100 µl
TEMED	4 µl

Ayırma jelini hazırlamak için yukarıda belirtilen çözeltiler belirtilen miktarlarda karıştırılmış ve en son TEMED eklenmiştir. Ayırma jeli en üstte 2 cm boşluk kalana kadar otomatik pipet yardımıyla dökülmüş ve bu esnada kabarcık oluşmamasına dikkat edilmiştir. Kabarcık oluşursa filtre kağıdı yardımıyla jel kurumadan hızlıca giderilmiştir. Kuruma olmaması için üzerine izopropil alkol dökülmüş ve 1 saat beklenmiştir. 1 saatin sonunda izopropil alkol yıkanarak ve filtre kağıdı ile kurutularak yükleme jeli (%5) otomatik pipet yardımıyla dökülmüş ve tarak uygulanmıştır. 15 dk beklendikten sonra tarak nazikçe çıkarılarak örnek kuyucuklarının oluşması sağlanmıştır

Yükleme jeli (%5) hazırlamak için kullanılan çözeltiler aşağıda gösterilmiştir:

Akrilamid-bisakrilamid stok çözeltisi (%30)	670 µl
Yükleme jeli tampon çözeltisi (Tris pH 6.8)	1 ml
SDS stok çözeltisi (%10)	40 µl
Saf su	2.2 ml
Amonyum persülfat (APS %10)	40 µl
TEMED	4 µl

Süpernatant örnekleri 10 µl süpernatant ve 10 µl sample buffer olacak şekilde karıştırılarak vortekslenmiştir. İlk kuyucuğa ladder, sonraki kuyucuklara ise sırası ile süpernatant örnekleri (*P. brevicompactum* pH 4.7, 25°C, 14 gün; *P. cavenicola* pH 5.0, 20 °C, 14 gün; *P. chrysogenum* pH 5.0, 25 °C, 14 gün; *P. corylophilum* pH 5.0, 25 °C, 14 gün; *P. brevicompactum* pH 4.7, 20 °C, 14 gün; *P. cavenicola* pH 5.0, 15 °C, 14 gün; *P. chrysogenum* pH 5.0, 20 °C, 14 gün; *P. corylophilum* pH 5.0, 25 °C, 11 gün) 10 µl olacak şekilde eklenmiştir. Elektrot tampon çözeltisi SDS-PAGE havuzundan taşırma yapılarak doldurulmuş ve 100 voltta çalıştırılmıştır. Yaklaşık 2 saat sonunda yürütme tamamlanmıştır.

Jellerin boyanması için öncelikle %40 etanol, %10 asetik asit içeren karışım çözeltide 15 dk çalkalama eşliğinde fikse edilmiş ve saf su ile 5 dk 3 tekrar şeklinde yıkama işlemi uygulanmıştır. Boya çözeltisi (Gel Code Blue Stain Reagent, Thermo Fisher Scientific, UK) ile 1 saat çalkalamalı muamele edilmiştir. Boyama sonrası 30 dakika 2 tekrar şeklinde durulandıktan sonra 1 gece boyunca saf su içinde bırakılarak ayrılmanın ve görüntünün netleşmesi sağlanmıştır.

3.2.10 Modelleme

Suşların proteaz enzim aktivitelerinin en yüksek değerlerinin tespit edilmesi ve üç boyutlu grafik olarak görülmesi amacıyla matematiksel modellemesi yapılmıştır. Modelleme yapılırken SigmaPlot 12.0 programı kullanılarak regresyon analizi yapılmıştır. Dört denklem denenmiştir ve en son Denklem (4)'ün geriye doğru regresyonu yapılarak elde edilen model kullanılmıştır.

Öncelikle enzim aktivitesi $\left(E = \frac{\text{U}}{\text{mL}\cdot\text{dk}}\right)$ dört suş için mümkün olan en basit modelle tanımlanmaya çalışılmıştır:

$$E = a_0 + a_1 \cdot t + a_2 \cdot pH + a_3 \cdot T \qquad \text{Denklem (1)}$$

Denklem (1)'de pH pH değeri, T sıcaklık (°C), t süre (gün), $a_0 - a_3$ ise model parametreleridir. Model uyum göstergesi olarak belirleme katsayısı (R^2), ayarlı belirleme katsayısı (R^2_{adj}) ve modelin standart hatası (RMSE) kullanılmıştır.

Denklem (2)'de değişkenlerin (t, pH ve T) ikili etkileşimleri (interaksiyon) modele dahil edilmiştir. Burada $b_0 - b_6$ model parametreleridir:

$$E = b_0 + b_1 \cdot t + b_2 \cdot pH + b_3 \cdot T + b_4 \cdot t \cdot pH + b_5 \cdot t \cdot T + b_6 \cdot pH \cdot T \qquad \text{Denklem (2)}$$

Denklem (3)'de ikinci dereceden terimlerin yer aldığı bir model kullanılarak daha uyumlu ve istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) parametrelere sahip bir model elde edilmeye çalışılmıştır. Burada $c_0 - c_6$ model parametreleridir:

$$E = c_0 + c_1 \cdot t + c_2 \cdot pH + c_3 \cdot T + c_4 \cdot t^2 + c_5 \cdot pH^2 + c_6 \cdot T^2 \qquad \text{Denklem (3)}$$

Denklem (4)'de değişkenlerin (t, pH ve T) ikili etkileşimleri ile birlikte ikinci dereceden terimler bir arada kullanılıştır. Burada $d_0 - d_9$ model parametreleridir:

$$E = d_0 + d_1 \cdot t + d_2 \cdot pH + d_3 \cdot T + d_4 \cdot t \cdot pH + d_5 \cdot t \cdot T + d_6 \cdot pH \cdot T + d_7 \cdot t^2 + d_8 \cdot pH^2 + d_9 \cdot T^2 \qquad \text{Denklem (4)}$$

Denklem (4)'de de anlamsız paramatreler gözlendiği için son modelde Denklem (4) kullanılarak geriye doğru regresyon (backward regression) yapılmış ve modeldeki ana değişkenler hariç (pH, T ve t) her seferinde istatistiksel olarak anlamsız bir parametre modelden uzaklaştırılarak model oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Suşların Proteaz Enzim Aktiviteleri

Penicillium cinsi küflerin peynir üretiminde proteaz enzim üretimleri yüksektir ve iyi proteaz üreticileri olduğu düşünülmektedir. Küflü peynirlerden izole edilen küflerin yüksek oranda *Penicillium* cinsine ait olduğu görülmüştür (Özkan 2010; Seri 2020). Bu yüzden yapılan çalışmada Divle Obruğu Tulum Peynirinden izole edilen (Ozturkoglu-Budak 2016a) ve en yüksek enzim aktivitesine sahip olan suşların parametre değerleri peynirin orijinal ortam koşulları baz alınıp belirlenmiştir (Ozturkoglu-Budak 2016b). Yapılan laboratuvar çalışmalarında proteaz enzim aktivite değerlerinin optimizasyonu ile *P. brevicompactum, P. cavernicola, P. chrysogenum ve P. corylophilum* suşlarının iyi birer proteaz üreticisi olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında peynir besi ortamının proteaz aktivite sonuçları ile suşların aktivite karşılaştırıldığında seçilen küf suşlarının proteaz üretme kapasitelerinin iyi olduğu gözlenmiştir.

4.1.1 Peynir besi ortamı

Peynir besi ortamının proteaz enzim aktivite sonuçları standart hatalarıyla birlikte (Ortalama ± standart sapma) pH, sıcaklık ve süreden oluşan 9 farklı koşuldaki değerleri Çizelge 4.1'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Peynir proteaz enzimi aktiviteleri (n=2) *

pH	T (°C)	t (Gün)	PROTEAZ AKTİVİTESİ (U/ml)
5.3	15	7	0.13 ± 0.01
5.3	20	7	0.11 ± 0.01
5.3	25	7	0.11 ± 0.00
5.3	15	11	0.10 ± 0.00
5.3	20	11	0.09 ± 0.03
5.0	25	11	0.18 ± 0.01
5.3	15	14	0.22 ± 0.02
4.7	20	14	0.14 ± 0.00
5.3	25	14	0.13 ± 0.00

*n=Tekerrür sayısı (Çizelgedeki değerler 2 tekerrür ortalamasıdır)

Enzim aktivitesinin en yüksek değeri pH 5.3, 15 °C ve 14 günde gözlenmiştir. Enzim aktivitesinin en düşük değeri pH 5.3 ve 20 °C ve 11 günde gözlenmiştir.

Kontrol ortamı olarak kullanılan sadece peynir besi ortamının proteaz enzim aktiviteleri ile küf suşlarının da proteaz enzim aktivitelerine etkisi karşılaştırILDIĞINDA enzim aktivitesini ciddi anlamda yükselttiği gözlenmiştir.

4.1.2 *Penicillium brevicompactum*

Penicillium brevicompactum suşunun proteaz enzim aktivite sonuçları standart hatalarıyla birlikte (Ortalama ± standart sapma) pH, sıcaklık ve süreden oluşan 27 farklı koşuldaki değerleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 *Penicillium brevicompactum* proteaz aktiviteleri (n=2) *

pH	T (°C)	t (Gün)	PROTEAZ AKTİVİTESİ (U/ml)
4.7	15	7	1.70 ± 0.49
4.7	20	7	2.37 ± 0.23
4.7	25	7	1.78 ± 0.07
5.0	15	7	1,62 ± 0.00
5.0	20	7	1.86 ± 0.00
5.0	25	7	1.75 ± 0.00
5.3	15	7	1.40 ± 0.48
5.3	20	7	2.18 ± 0.00
5.3	25	7	1.53 ± 0.60
4.7	15	11	2.67± 0.00
4.7	20	11	2.90 ± 0.22
4.7	25	11	2.29 ± 0.78
5.0	15	11	2.43 ± 0.00
5.0	20	11	1.68 ± 0.00
5.0	25	11	2.25 ± 0.00
5.3	15	11	2.01 ± 0.67
5.3	20	11	1.92 ± 0.11
5.3	25	11	2.50 ± 0.10
4.7	15	14	3.31 ± 0.30
4.7	20	14	3.09 ± 0.65
4.7	25	14	3.42 ± 0.58
5.0	15	14	1.89 ± 0.05
5.0	20	14	2.29 ± 0.04
5.0	25	14	1.66 ± 0.48
5.3	15	14	3.06 ± 0.61
5.3	20	14	2.49 ± 0.11
5.3	25	14	2.36 ± 0.38

*n=Tekerrür sayısı (Çizelgedeki değerler 2 tekerrür ortalamasıdır)

Enzim aktivitesinin en yüksek değeri pH 4.7, 25 °C ve 14 günde gözlenmiştir. Enzim aktivitesinin en düşük değeri pH 5.3 ve 15 °C ve 7 günde gözlenmiştir. Ozturkoglu-Budak vd. (2016b) Skim Milk agar besiyerinde geliştirdiği *P. brevicompactum* suşunun proteaz enzim aktivitesinin 14.19 μg/ml olduğunu belirtmişlerdir ve güçlü proteaz üreticilerinden biri olarak tanımlamışlardır. Benzer şekilde bu çalışmada da en yüksek aktivitelerden biri *P. brevicompactum* suşunda pH 4.7, 25 °C ve 14 günde tespit edilmiştir. Küf türlerinin proteaz üretim kapasitelerinin araştırıldığı çalışmada en iyi üreticinin *Aspergillus fumigatus* olduğunu tespit etmişlerdir (Berikten ve Kıvanç 2021). Yapılan bir diğer çalışmada farklı *Aspergillus* küf suşlarının proteaz aktviteleri belirlenirken *A. vadensis, A. niger, A. tubingensis, A. foetidus, A. japonicus, A. oryzae ve A. sojae* suşları arasında en yüksek proteaz aktivitesinin *A. niger* türünde pH 4.0'da tespit edilmiştir. Çalışmamızda da *P. brevicompactum* suşu bu değere yakın olan pH 4.7'de en yüksek aktiviteyi göstermiştir (De Vries vd. 2004).

Başka bir çalışmada bakteri türü olan *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun hücre dışı proteaz aktivitesinin belirlenmesinde pH ve sıcaklığın anlamlı parametreler olduğu belirlenmiştir (Değirmen 2019). Benzer olarak *Bacillus sp. MT01* suşunun iyi bir proteaz üreticisi olduğu tespit edilmiştir (Tolan 2015). Bdewe (2020) *Bacillus cereus* bakteri türünün proteaz enzim aktivitesi üzerine çalışmış ve çalışmamızla benzer şekilde sıcaklık, pH ve inkübasyon süresinin anlamlı olduğu tespit etmiştir. *Bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus polymxa bakteri* türlerinin saflaştırılması ve optimizasyonu ile ilgili proteaz aktivitelerinin sıcaklık, pH parametreleri anlamlı bulunmuştur (Gerze 2003). *Bacillus sp.* suşlarının proteaz enzim aktiviteleri incelendiğinde optimum pH 7.0 olarak bulunmasına karşın aktivitenin çalışmamızdaki bulgular gibi asidik tarafa daha yakın olduğu tespit edilmiştir (Sevinç 2010).

4.1.3 *Penicillium cavernicola*

Penicillium cavernicola suşunun proteaz enzim aktivite sonuçları standart hatalarıyla birlikte (Ortalama ± standart sapma) pH, sıcaklık ve süreden oluşan 27 farklı koşuldaki değerleri Çizelge 4.3'te belirtilmiştir.

Çizelge 4.3 *Penicillium cavernicola* proteaz aktiviteleri (n=2) *

pH	T (°C)	t (Gün)	PROTEAZ AKTİVİTESİ (U/ml)
4.7	15	7	0.54 ± 0.02
4.7	20	7	0.36 ± 0.00
4.7	25	7	0.29 ± 0.00
5.0	15	7	0.48 ± 0.00
5.0	20	7	0.42 ± 0.00
5.0	25	7	0.36 ± 0.00
5.3	15	7	1.21 ± 0.05
5.3	20	7	1.35 ± 0.15
5.3	25	7	1.01 ± 0.04
4.7	15	11	0.51 ± 0.01
4.7	20	11	0.38 ± 0.00
4.7	25	11	0.38 ± 0.00
5.0	15	11	0.56 ± 0.00
5.0	20	11	0.36 ± 0.00
5.0	25	11	0.49 ± 0.00
5.3	15	11	1.65 ± 0.13
5.3	20	11	1.66 ± 0.39
5.3	25	11	1.62 ± 0.26
4.7	15	14	0.40 ± 0.00
4.7	20	14	1.84 ± 0.42
4.7	25	14	1.97 ± 0.48
5.0	15	14	2.35 ± 0.21
5.0	20	14	2.24 ± 0.40
5.0	25	14	2.20 ± 0.02
5.3	15	14	1.94 ± 0.08
5.3	20	14	2.01 ± 0.47
5.3	25	14	1.99 ± 0.49

*n=Tekerrür sayısı (Çizelgedeki değerler 2 tekerrür ortalamasıdır)

Enzim aktivitesinin en yüksek değeri pH 5.0, 15 °C ve 14 günde gözlenmiştir. Enzim aktivitesinin en düşük değeri pH 5.0 ve 25 °C ve 7 günde gözlenmiştir. Sayedi (2021) yaptığı araştırmada küflerin proteaz enzim aktiviteleri incelemiş ve çalışmamızla benzer şekilde en yüksek proteaz aktivitelerinin *Penicillium* cinslerine ait olduğunu gözlemlemiştir. En yüksek aktivitelerin *Penicillium janczewskii*, *Penicillium* sp., *Penicillium turbarum* ve *Penicillium turbatum* suşlarında olduğunu tespit etmiştir.

Bakteri türü *Bacillus* sp. P22 izolatıyla proteaz enzim optimizasyon çalışması yapılmış ve sıcaklığın 15-50 °C arasında kararlı olduğu optimum sıcaklık 40 °C tespit etmiştir (Temel 2015). *Bacillus subtilis megatherium* bakterisinin proteaz enziminin saflaştırılması çalışmasında optimum sıcaklığın 37 °C'de olduğunu ve anlamlı olduğunu tespit etmiştir (Erdoğan 2020).

4.1.4 *Penicillium chrysogenum*

Penicillium chrysogenum suşunun proteaz enzim aktivite sonuçları standart hatalarıyla birlikte (Ortalama ± standart sapma) pH, sıcaklık ve süreden oluşan 27 farklı koşuldaki değerleri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 *Penicillium chrysogenum* proteaz aktiveleri (n=2) *

pH	T (°C)	t (Gün)	PROTEAZ AKTİVİTESİ (U/ml)
4.7	15	7	0.56 ± 0.06
4.7	20	7	0.70 ± 0.07
4.7	25	7	0.48 ± 0.13
5.0	15	7	1.42 ± 0.20
5.0	20	7	1.59 ± 0.55
5.0	25	7	2.10 ± 0.74
5.3	15	7	1.18 ± 0.04
5.3	20	7	1.04 ± 0.01
5.3	25	7	0.81 ± 0.02
4.7	15	11	0.50 ± 0.01
4.7	20	11	0.56 ± 0.15
4.7	25	11	0.41 ± 0.00
5.0	15	11	2.13 ± 0.51
5.0	20	11	1.97 ± 0.73
5.0	25	11	1.32 ± 0.91
5.3	15	11	1.60 ± 0.17
5.3	20	11	1.58 ± 0.07
5.3	25	11	1.36 ± 0.02
4.7	15	14	0.62 ± 0.08
4.7	20	14	0.34 ± 0.00
4.7	25	14	0.55 ± 0.02
5.0	15	14	2.54 ± 0.31
5.0	20	14	2.94 ± 0.52
5.0	25	14	2.87 ± 0.63
5.3	15	14	1.95 ± 0.11
5.3	20	14	1.82 ± 0.02
5.3	25	14	1.64 ± 0.02

*n=Tekerrür sayısı (Çizelgedeki değerler 2 tekerrür ortalamasıdır)

Enzim aktivitesinin en yüksek değeri pH 5.0, 20 °C ve 14 günde gözlenmiştir. Enzim aktivitesinin en düşük değeri pH 4.7 ve 20 °C ve 14 günde gözlenmiştir. Ozturkoglu-Budak vd. (2016b) Skim Milk agar besiyerinde geliştirdiği *P. chrysogenum* suşunun proteaz enzim aktivitesinin 11.85 µg/ml olduğunu belirtmişlerdir ve güçlü proteaz üreticilerinden biri olarak tanımlamışdır. Özkan (2010) en iyi proteaz üreticilerini bulmak amacıyla *Penicillium piceum, Penicillium chrysogenum, Aspergillus wentii ve*

Trichothecium roseum türleri ile çalışmış ve *Penicillium chrysogenum* türünün bağıl proteaz enzim aktivitesinin %97.22 olduğunu bildirerek iyi bir proteaz üreticisi olduğunu gözlemlemiştir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da en yüksek aktivitelerden birinin *P. chrysogenum* suşunda pH 5, 20 °C ve 14 günde tespit edilmiştir ve bu suşun iyi bir proteaz üreticisi olduğunu göstermiştir. Asar (2016) *Bacilllus mageterium* bakteri türünün çalışmamızla aynı dalga boyunu kullanarak, 660 nm dalga boyunda proteaz enzim aktivitesinin pH 8 ve 30 °C'de en yüksek olduğu tespit etmiştir. *Bacillus halodurans* suşunun proteaz aktivitesi 660 nm dalga boyunda ölçülmüş optimum değerlerin 30 °C ve pH 9'da olduğunu tespit etmişlerdir (Balachandran vd. 2021).

4.1.5 *Penicillium corylophilum*

Çizelge 4.5 *Penicillium corylophilum* proteaz aktiviteleri (n=2) *

pH	T (°C)	t (Gün)	PROTEAZ AKTİVİTESİ (U/ml)
4.7	15	7	1.48 ± 0.58
4.7	20	7	1.79 ± 0.38
4.7	25	7	1.11 ± 0.47
5.0	15	7	1.56 ± 0.56
5.0	20	7	2.61 ± 0.61
5.0	25	7	3.17 ± 0.92
5.3	15	7	1.45 ± 0.37
5.3	20	7	1.90 ± 0.33
5.3	25	7	1.91 ± 0.03
4.7	15	11	2.68 ± 0.36
4.7	20	11	2.44 ± 0.00
4.7	25	11	1.71 ± 0.39
5.0	15	11	3.22 ± 0.06
5.0	20	11	4.07 ± 1.04
5.0	25	11	4.17 ± 0.85
5.3	15	11	2.43 ± 0.41
5.3	20	11	2.33 ± 0.14
5.3	25	11	3.18 ± 0.36
4.7	15	14	2.61 ± 0.23
4.7	20	14	2.37 ± 0.85
4.7	25	14	1.87 ± 0.34
5.0	15	14	2.79 ± 0.66
5.0	20	14	2.10 ± 0.00
5.0	25	14	2.26 ± 0.00
5.3	15	14	2.94 ± 0.15
5.3	20	14	3.02 ± 0.91
5.3	25	14	1.91 ± 0.00

*n=Tekerrür sayısı (Çizelgedeki değerler 2 tekerrür ortalamasıdır)

Penicillium corylophilum suşunun proteaz enzim aktivite sonuçları standart hatalarıyla birlikte (Ortalama ± standart sapma) pH, sıcaklık ve süreden oluşan 27 farklı koşuldaki değerleri Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Enzim aktivitesinin en yüksek değeri pH 5, 25 °C ve 11 günde gözlenmiştir. Enzim aktivitesinin en düşük değeri pH 4.7 ve 25 °C ve 7 günde gözlenmiştir. Ozturkoglu-Budak vd. (2016b) skim milk agar besiyerinde geliştirdiği *P. corylophilum* suşunun proteaz enzim aktivitesinin 13.44 µg/ml olduğunu belirtmişlerdir ve güçlü proteaz üreticilerinden biri olarak tanımlamışlardır. *P. corylophilum* ve *P. waksmanii* suşlarının proteaz enzim aktivitesinin belirlendiği çalışmada, *P. corylophilum* türü buğday kepeği içeren ortamda en yüksek proteaz aktivitesini göstermiştir (da Silva vd. 2013). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da en yüksek aktivitelerden birinin *P. corylophilum* suşunda pH 5, 25 °C ve 11 günde tespit edilmiştir ve bu suş iyi bir proteaz üreticisi olabileceği düşünülmektedir. Başka bir benzer çalışmada *Aspergillus, Alternaria, Cladosporium, Penicillium* küf cinslerinin amilaz, proteaz ve lipaz üretme yetenekleri üzerine çalışmıştır. Bu küflerden proteaz üreticisi olarak *Penicillium* cinslerinde 255 kültürün 135'i pozitif sonuç vermesine karşın *Aspergillus, Alternaria ve Cladosporium* cinslerinden pozitif sonuç veren olmamıştır. Böylelikle *Penicillium* cinslerinin iyi bir proteaz üreticisi olduğu sonucuna varmışlardır (Korcan vd. 2007).

Çalışmamızda sıcaklığın enzim üretiminde anlamlı bir parametre olarak bulunduğu *P. corylophilum* ile benzer olarak Demir (2020) yaptığı araştırmada *Bacillus* sp. EBTA6 bakteri izolatının proteaz enzim üretimi için sıcaklık ve maya özütü konsantrasyonunun anlamlı olduğunu belirtmiştir. *Bacillus* suşlarına ait proteaz enzimin optimizasyonu ile ilgili araştırmada 660 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmış ve proteaz üretimi için sıcaklık ve pH parametrelerinin anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Güngör 2011). Özden (2014) *Bacillus subtilis* RSKK-11014 suşunun proteaz üretiminde 660 nm dalga boyunda ölçülen değerlerde sıcaklığın anlamlı olduğunu tespit etmiştir. 40 °C'de enzimin kararlı olduğu fakat 60 °C ve 70 °C'de enzimin aktivitesini hızla kaybettiği gözlenmiştir. *Bacillus sp.* suşunun ürettiği çeşitli enzimlerin aktivite değerleri hesaplamış ve proteaz enziminin optimum sıcaklığı çalışmamızda *P. corylophilum* suşu ile aynı olarak 25 °C olduğu tespit edilmiştir (Güven Gülhan 2014). Karaman (2023) *Geobacillus*

thermoleovorans HBB208 ve Görmez ve Gülmüş (2018) *Bacillus pumilus* NK14 bakteri suşlarının proteaz enzim aktivitesini belirlemek için spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda çalışmışlardır. *Pseudomonas* sp. KE-38 bakterisinin proteaz enzim aktivitesinin 25 °C'ye kadar yüksek stabilite gösterdiği tespit edilmiştir (Bozlak 2023).

4.2 Süpernatantların SDS-PAGE Protein Profilleri

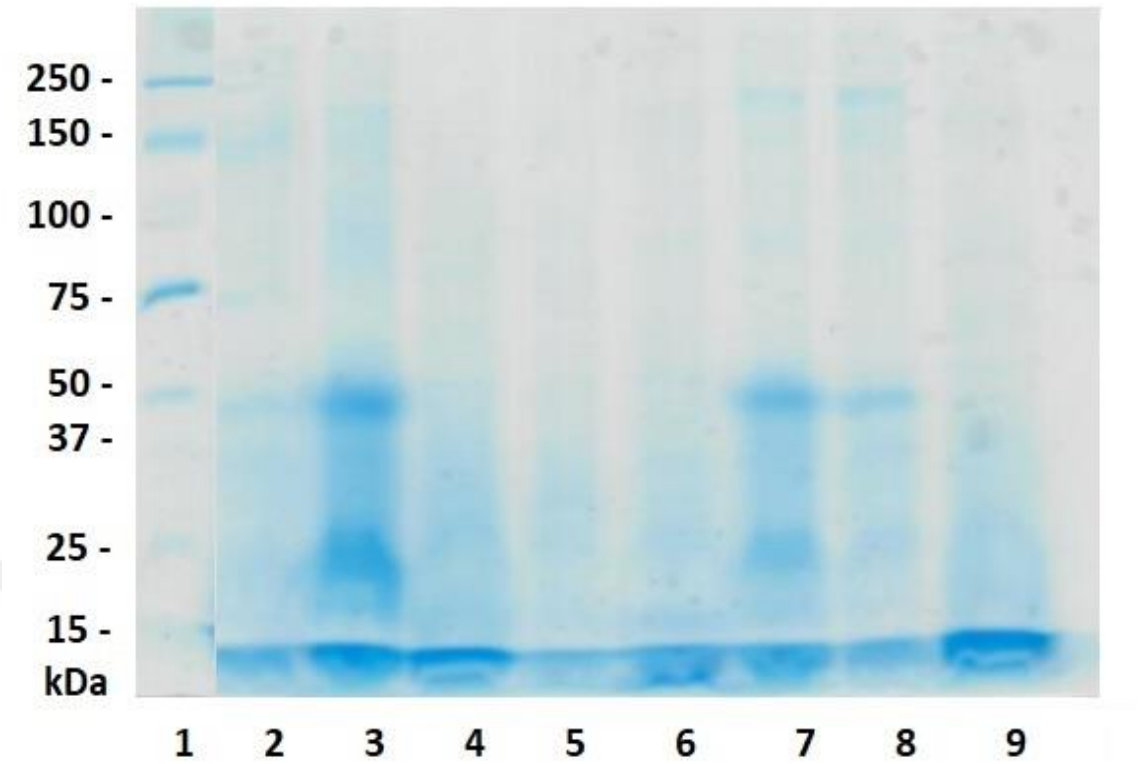
Proteinlerin molekül ağırlıklarını bulmak için her bir suşun en yüksek enzim aktivitesine sahip süpernatantları kullanılmıştır. Bu yüzden proteaz enzim aktivitelerinin ortalamaları üzerinden en yüksek değerleri verenler olmak üzere toplamda 8 adet süpernatant belirlenmiştir.

P. brevicompactum türü için en yüksek aktivite değerlerinin pH 4.7, 25 °C, 14 günde pH 4.7, 20 °C, 14 günde olduğu tespit edilmiştir. Bu parametre değerlerindeki molekül ağırlıkları ise 150 kDa, 75 kDa ve 50 kDa civarında bant oluşumu gözlenmiştir.

P. cavernicola türü için en yüksek aktivite değerlerinin pH 5.0, 20 °C, 14 günde ve pH 5.0, 15 °C, 14 günde olduğu tespit edilmiştir. Molekül ağırlıkları tespitinde ise 200 kDa, 50 kDa ve 25 kDa civarında bant oluşumu gözlenmiştir.

P. chrysogenum türü için en yüksek aktivite değerlerinin pH 5.0, 25 °C, 14 günde ve pH 5.0, 20 °C, 14 günde olduğu tespit edilmiştir. Molekül ağırlıkları tahminlerinde belirgin bir bant oluşumu gözlenmemiştir. Molekül ağırlıkları tahminlerinde ise 250 kDa ve 50 kDa civarında bant oluşumu gözlenmiştir. Kazein α, β ve κ olmak üzere üç türdür. Bunlardan α-s1 kazein 22.0-23.7 kDa, α-s2 kazein ise 25.2 kDa molekül ağırlığındadır. β kazein 23.9-24.0 kDa ve κ kazein ise 19 kDa molekül ağırlığındadır (Modler 1985).

P. corylophilum türü için en yüksek aktivite değerleri pH 5.0, 25 °C, 14 günde ve pH 5.0, 25 °C, 11 günde olduğu tespit edilmiştir. Molekül ağırlıkları tahminlerinde ise 25 kDa civarında bant oluşumları gözlenmiştir.



Şekil 4.1 SDS-PAGE protein profilleri 1: Ladder, 2: *P. brevicompactum* (pH 4.7, 25°C,14. gün), 3: *P. cavernicola* (pH 5.0, 20 °C, 14. gün), 4: *P. chrysogenum* (pH 5.0, 25 °C, 14. gün), 5: *P. corylophilum* (pH 5.0, 25 °C, 14. gün), 6: *P. brevicompactum* (pH 4.7, 20 °C, 14. gün), 7: *P. cavernicola* (pH 5.0, 15 °C, 14. gün), 8: *P. chrysogenum* (pH 5.0, 20 °C, 14. gün), 9: *P. corylophilum* (pH 5.0, 25 °C, 11. Gün)

P. chrysogenum suşunun molekül ağırlığı yaklaşık olarak 50 kDa olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada yapılan analiz sonucunda *P. chrysogenum* X5 suşunun molekül ağırlığını 43 kDa olarak tespit etmişlerdir (Benmrad vd. 2018). Başka bir araştırmada *Bacillus subtilis magetherium* molekül ağırlığını 45 kDa civarında olduğunu bildirmiştir (Erdoğan 2020). *Penicillium* cinsi küflerin protein molekül ağırlıkları incelenmiş ve 50 kDa'dan büyük molekül ağırlıklarının çok fazla değişmediğini tespit etmiştir, 20-40 kDa arasındaki bantların neredeyse yok olduğunu gözlenmiştir (Öztürkoğlu Budak 2016). Peynir olgunlaşmasında en önemli değişim proteolizdir ve kazein önce büyük peptitlere sonra da küçük peptitlere parçalanır (Koçak 2015). Proteazlar, peptit bağlarını parçalamada katalizör görevi gördüklerinden, yüksek enzim aktivitesi olan suşlarda daha küçük peptitler oluşur, daha fazla parçalanma gerçekleşir (Çelik 2018).

En yüksek aktivite değerine sahip olan *Penicillium corylophilum*'un (pH 5.0, 25 °C, 14. gün) beklendiği gibi en düşük molekül ağırlığına sahip olduğu gözlenmiştir. En düşük aktivite değerine sahip olan *Penicillium cavernicola*'un (pH 5.0, 15 °C 14. gün) ise beklendiği gibi en yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunun sonucunda da SDS-PAGE protein profillerinde daha alt kısımlarda daha fazla bant oluşumu gözlenmiştir. Enzim aktivite değerleri yüksek olan süpernatantların bantları daha az ve daha belirsiz olduğu görülmüştür. Protein molekül ağırlıkları daha düşüktür. Enzim aktivite değerleri düşük olanların ise bantları daha belirgin olduğu görülmüştür ve molekül ağırlıkları daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4.3 Proteaz Enzim Üretimleri Matematiksel Modelleri

Çizelge 4.6 Denklem (1)'in verilere uygulanması sonucu elde edilen parametreler ± parametrelerin standart hataları ve model uyum göstergeleri

	P. brevicompactum	*P. cavernicola*	*P. chrysogenum*	*P. corylophilum*
a_0	5.03 ± 1.50	-7.11 ± 1.48	-6.41 ± 2.01	**-2.30 ± 2.47**
a_1	0.12 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.04
a_2	-0.81 ± 0.29	1.27 ± 0.28	1.40 ± 0.39	**0.68 ± 0.47**
a_3	**-0.0054 ± 0.017**	**0.0065 ± 0.017**	**-0.0078 ± 0.023**	**0.011 ± 0.028**
R^2	0.413	0.636	0.307	0.160
R^2_{adj}	0.375	0.608	0.263	0.106
RMSE	0.501	0.466	0.680	0.816

Koyu renkle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p > 0.05$) parametrelerdir.

Modellemede Denklem (1)'den elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da belirtilmiştir. Çizelge 4.6'dan da görüldüğü gibi Denklem (1)'in uyumu iyi olmadığı görülmüştür. Çünkü dört suşun üçünde R^2 ve $R^2_{adj} < 0.5$ tespit edilmiştir. Ayrıca RMSE değerinin 0'a yakın olması gerekirken 0.816 gibi (*P. corylophilum*) yüksek bir değer elde edilmiştir. Tüm bunların yanı sıra tüm suşlar için sıcaklığa ait parametre (a_3) istatistiksel olarak anlamsız olduğu görülmüştür ($p > 0.05$). *Aspergillus flavus* B2 küf suşuyla yapılan istatistiksel optimizasyon çalışmasında aynı model [Denklem (1)] kullanılarak enzim karakterizasyonu yapılmıştır (Wahab vd. 2023). Modellemede Denklem (1) sonuçları uyumsuz çıktığı için Denklem (2) denenmiştir ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.7 Denklem (2)'nin verilere uygulanması sonucu elde edilen parametreler ± parametrelerin standart hataları ve model uyum göstergeleri

	P. brevicompactum	*P. cavernicola*	*P. chrysogenum*	*P. corylophilum*
b_0	**0.55 ± 9.21**	-16.9 ± 8.3	**-2.66 ± 12.2**	**13.4 ± 14.6**
b_1	**0.57 ± 0.52**	**0.49 ± 0.50**	**-0.78 ± 0.70**	**0.12 ± 0.08**
b_2	**-0.13 ± 1.8**	3.6 ± 1.6	**0.57 ± 2.42**	**-3.1 ± 2.9**
b_3	**-0.035 ± 0.36**	**0.22 ± 0.35**	**0.28 ± 0.49**	**-0.62 ± 0.57**
b_4	**-0.068 ± 0.10**	**-0.097 ± 0.097**	**0.18 ± 0.14**	**0.057 ± 0.16**
b_5	**-0.0053 ± 0.0059**	**0.009 ± 0.006**	**-0.0017 ± 0.008**	**-0.015 ± 0.010**
b_6	**0.0031 ± 0.071**	**-0.062 ± 0.068**	**-0.05 ± 0.09**	**0.16 ± 0.11**
R^2	0.430	0.674	0.338	0.244
R^2_{adj}	0.350	0.620	0.250	0.139
RMSE	0.511	0.459	0.686	0.800

Koyu renkle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p > 0.05$) parametrelerdir.

Denklem (2), Denklem (1)'e göre model uyum göstergelerinde önemli bir iyileşme sağlamadığı gibi *P. cavernicola* suşundaki iki parametre hariç tüm suşların model parametreleri istatistiksel olarak anlamsız olduğu görülmüştür ($p > 0.05$). Bu yüzden ikinci dereceden terimlerin yer aldığı bir model kullanılarak hem daha iyi uyuma sahip hem de istatistiksel anlamlı ($p \leq 0.05$) parametrelere sahip bir model elde edilmeye çalışılmıştır. Denklem (3)'den çıkan sonuçlar Çizelge 4.8'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.8 Denklem (3)'ün verilere uygulanması sonucu elde edilen parametreler ± parametrelerin standart hataları ve model uyum göstergeleri

	P. brevicompactum	*P. cavernicola*	*P. chrysogenum*	*P. corylophilum*
c_0	**3.6 ± 3.1**	**-4.2 ± 2.7**	**-6.5 ± 4.0**	-10.3 ± 4.5
c_1	**0.18 ± 0.27**	-0.66 ± 0.24	**-0.22 ± 0.36**	1.31 ± 0.39
c_2	-0.80 ± 0.29	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.39	**0.59 ± 0.43**
c_3	**0.12 ± 0.25**	**0.11 ± 0.22**	**0.16 ± 0.32**	**0.29 ± 0.37**
c_4	**-0.068 ± 0.10**	0.04 ± 0.01	**0.015 ± 0.017**	-0.058 ± 0.019
c_5	**-0.0028 ± 0.013**	—[a]	—	—
c_6	**-0.0031 ± 0.006**	**-0.0026 ± 0.0054**	**-0.0042 ± 0.0081**	**-0.0072 ± 0.0092**
R^2	0.417	0.726	0.322	0.312
R^2_{adj}	0.351	0.689	0.248	0.234
RMSE	0.510	0.415	0.687	0.755

Koyu renkle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p > 0.05$) parametrelerdir.
[a] Doğrudaş (kolineer) olduğundan modelden uzaklaştırılmıştır.

Bu denemede de anlamsız parametreler ($p > 0.05$) elde edilmiştir. Son olarak değişkenlerin (pH, T ve t) ikili etkileşimleri ile ikinci dereceden terimlerin bir arada kullanılması kararlaştırılmıştır.

Wahab vd. (2023) tarafından Denklem (4) ile benzer olarak değişkenlerin ikili etkileşimleri ve ikinci dereceden terimlerin bir arada kullanıldığı *Aspergillus flavus* B2 küf suşu için enzim aktivitesinin değerlendirildiği bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. *Aspergillus Niger* NRRL 330 suşuyla fungal enzim üretiminin optimizasyonu için inokulum büyüklüğü, karıştırma hızı ve havalandırma parametre değişkenlerinin ikili etkileşimleri ve ikinci dereceden terimleri bir arada kullanılarak oluşturulan model kullanılmıştır (Iram vd. 2022).

Mucor circinelloides küf suşunun fungal inülinaz enzim üretiminin optimizasyonu için parametre değişkenlerinin ikili etkileşimleri ve ikinci dereceden terimleri bir arada kullanılarak oluşturulan model kullanılmıştır ve validasyon sonucu denklemin, modelin güvenilirliği kanıtlanmıştır (Singh vd. 2020). *Bacillus aryabhattai* Ab15-ES suşu kullanılarak proteaz enzim aktivitesi değerlendirirken 5 bağımsız değişken kullanılmış ve modellemesinde ikinci dereceden polinom denklemi kullanmışlardır (Adetunji ve Olaniran 2020). *Pseudomonas sp.* 13159349 bakteri suşunun enzim üretimini optimize etmek için 11 parametre değişkeni kullanılmıştır.

Bu çalışmadakine benzer olarak başka bir çalışmada kullanılan Denklem (4) sonucunda anlamlı model oluşturarak pektinaz enzim aktivitesinin optimum koşullarını belirlemişlerdir (Arpana vd. 2023). Yapılan farklı bir çalışmada ise oksidatif yeşil enzim üretiminin optimizasyonu için yine Denklem (4) kullanılarak modelleme yapıldığı görülmüştür (Vilar vd. 2021).

Denklem (4)'ün sonuçları Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 Denklem (4)'ün verilere uygulanması sonucu elde edilen parametreler ± parametrelerin standart hataları ve model uyum göstergeleri

	P. brevicompactum	*P. cavernicola*	*P. chrysogenum*	*P. corylophilum*
d_0	**-1.1 ± 9.9**	**-12.6 ± 7.7**	**-2.46 ± 12.9**	**2.33 ± 14.1**
d_1	**0.64 ± 0.59**	**-0.34 ± 0.51**	**-1.05 ± 0.79**	**1.49 ± 0.86**
d_2	**-0.099 ± 1.87**	3.3 ± 1.5	**0.54 ± 2.45**	**-2.70 ± 2.63**
d_3	**0.17 ± 0.46**	**0.27 ± 0.38**	**0.41 ± 0.59**	**-0.23 ± 0.64**
d_4	**-0.071 ± 0.10**	**-0.089 ± 0.087**	**0.18 ± 0.14**	**0.036 ± 0.15**
d_5	**-0.0053 ± 0.0061**	**0.008 ± 0.005**	**-0.0017 ± 0.0081**	**-0.017 ± 0.0089**
d_6	**0.0029 ± 0.073**	**-0.05 ± 0.06**	**-0.05 ± 0.09**	**0.15 ± 0.10**
d_7	**-0.0026 ± 0.013**	0.038 ± 0.011	**0.014 ± 0.017**	-0.059 ± 0.018
d_8	—[a]	—	—	—
d_9	**-0.0033 ± 0.006**	**-0.0026 ± 0.0053**	**-0.0037 ± 0.008**	**-0.0076 ± 0.0089**
R^2	0.434	0.756	0.351	0.401
R^2_{adj}	0.324	0.699	0.230	0.285
RMSE	0.521	0.409	0.695	0.729

Koyu renkle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p > 0.05$) parametrelerdir.
[a] Doğrudaş (kolineer) olduğundan modelden uzaklaştırılmıştır.

Son denemede de anlamsız parametrelerin ($p > 0.05$) modelde [Denklem (4)] yer aldığı görülmüştür. Denenen tüm modeller [Denklem (1), (2), (3) ve (4)] içerisinde en iyi model uyum göstergelerine sahip olması nedeniyle enzim aktivitesini uygun bir modelle tanımlamak amacıyla Denklem (4) kullanılarak geriye doğru regresyon (backward regression) yapılmıştır.

Modeldeki ana değişkenler hariç (pH, T ve t) her seferinde istatistiksel olarak anlamsız bir parametre modelden uzaklaştırılmış ve her bir suş için çizilen model Çizelge 4.10'da belirtilmiştir.

Çizelge 4.10 Denklem (4)'ün geriye doğru regresyon yapılarak verilere uygulanması sonucu elde edilen parametreler ± parametrelerin standart hataları ve model uyum göstergeleri

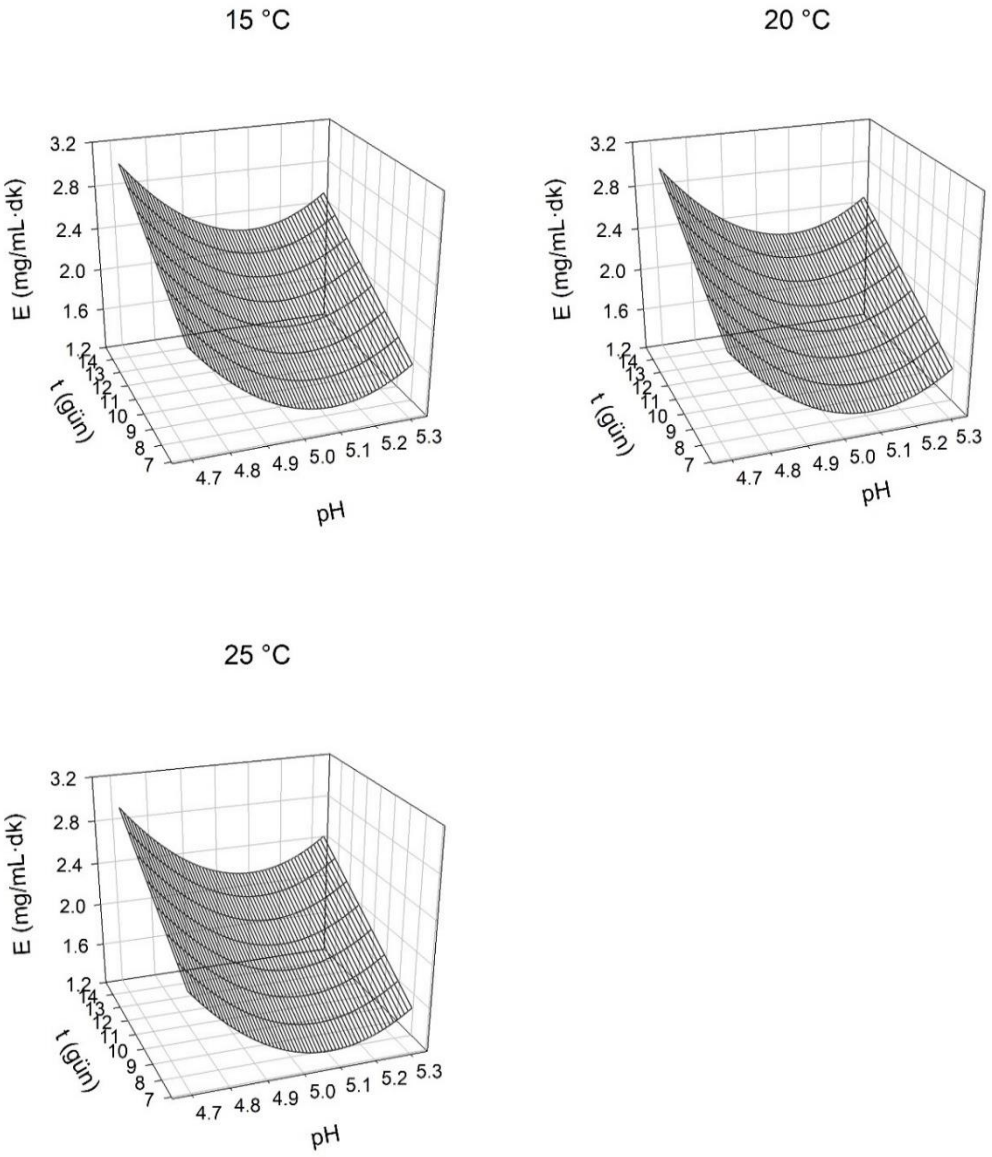
	P. brevicompactum	*P. cavernicola*	*P. chrysogenum*	*P. corylophilum*
d_0	138.7 ± 37.7	-3.2 ± 1.7	-302.0 ± 31.9	-227.9 ± 52.5
d_1	0.13 ± 0.02	-0.66 ± 0.24	-0.91 ± 0.39	1.59 ± 0.37
d_2	-54.4 ± 15.1	1.3 ± 0.3	122.0 ± 12.7	87.6 ± 21.1
d_3	**-0.008 ± 0.05**	**0.004 ± 0.02**	**-0.01 ± 0.05**	0.18 ± 0.08
d_4	—[a]	—	0.20 ± 0.08	—
d_5	—	—	—	-0.017 ± 0.0076
d_6	—	—	—	—
d_7	—	0.04 ± 0.01	—	-0.055 ± 0.016
d_8	5.3 ± 1.5	—	-12.3 ± 1.3	-8.71 ± 2.11
d_9	—	—	—	—
R^2	0.541	0.724	0.779	0.542
R^2_{adj}	0.500	0.695	0.756	0.478
RMSE	0.448	0.411	0.392	0.623

Koyu renkle gösterilenler istatistiksel olarak anlamsız ($p > 0.05$) parametrelerdir.
[a] Geriye doğru regresyon yapılarak modelden atılan istatistiksel olarak anlamsız ($p > 0.05$) parametreler.

Çizelge 4.10'dan da görüldüğü gibi *P. corylophilum* suşu hariç diğer suşlar için sıcaklığa ait parametre (d_3) istatistiksel olarak anlamsız ($p > 0.05$) olmasına rağmen modelde olmaya zorlanmıştır çünkü pH, T ve t ile birlikte modeldeki [Denklem (4)] ana değişkenlerdir. Denenen tüm modeller içinde en iyi uyum gösteren model geriye doğru regresyon yapılarak kullanılan bu model olmuştur.

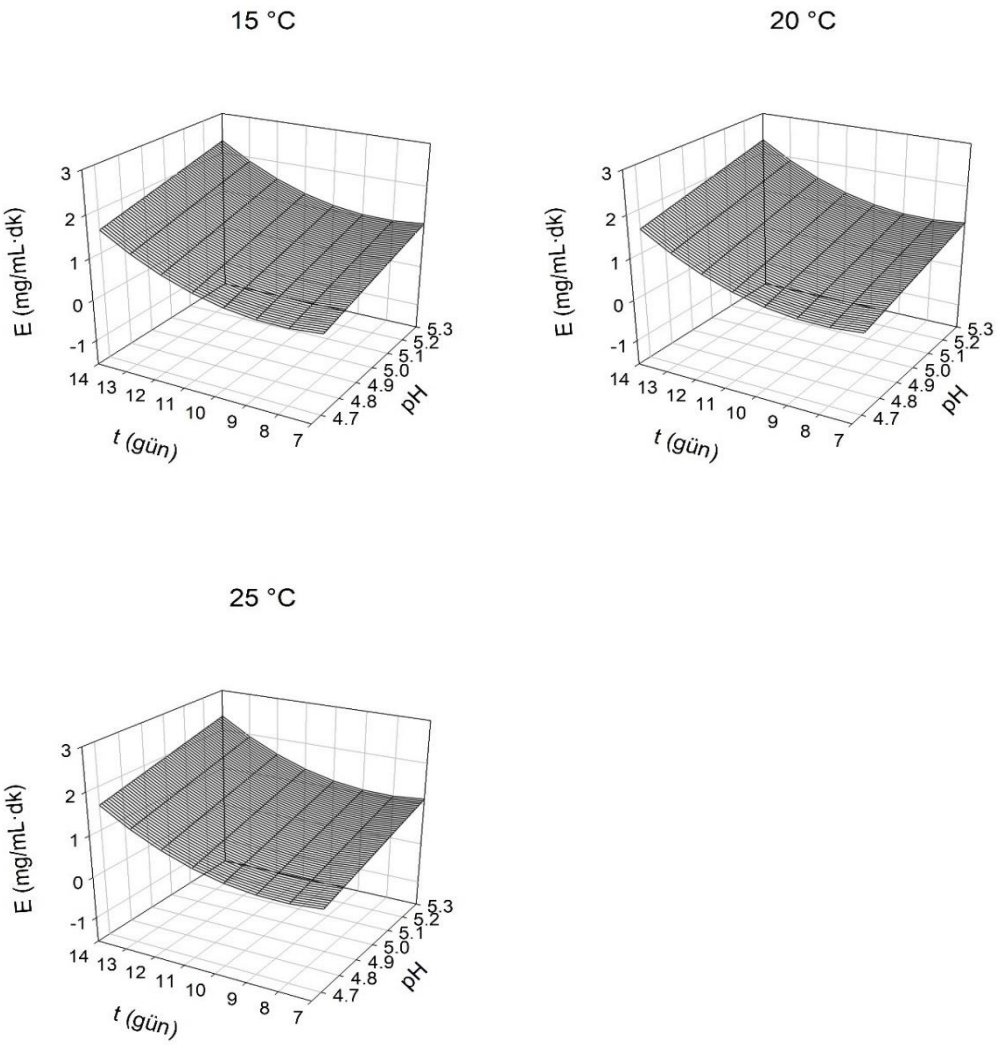
Orijinal modelde [Denklem (4)] 10 parametre olmasına rağmen geriye doğru regresyon neticesinde parametre sayısı azaltılabilmiş ve daha basit modellerin kullanılması mümkün olmuştur. Örneğin *P. brevicompactum* ve *P. cavernicola* suşları için beş, *P. chrysogenum* suşu için altı, *P. corylophilum* suşu için yedi parametreli modeller elde edilmiştir.

Çizelge 4.10'da yer alan parametre değerleri kullanılarak modelin üç boyutlu (3D) yüzeyini elde etmek ve grafik üzerinde gösterebilmek mümkündür. *P. brevicompactum* suşu için üç farklı sıcaklıkta (15, 20 ve 25 °C) elde edilen yüzeyler Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



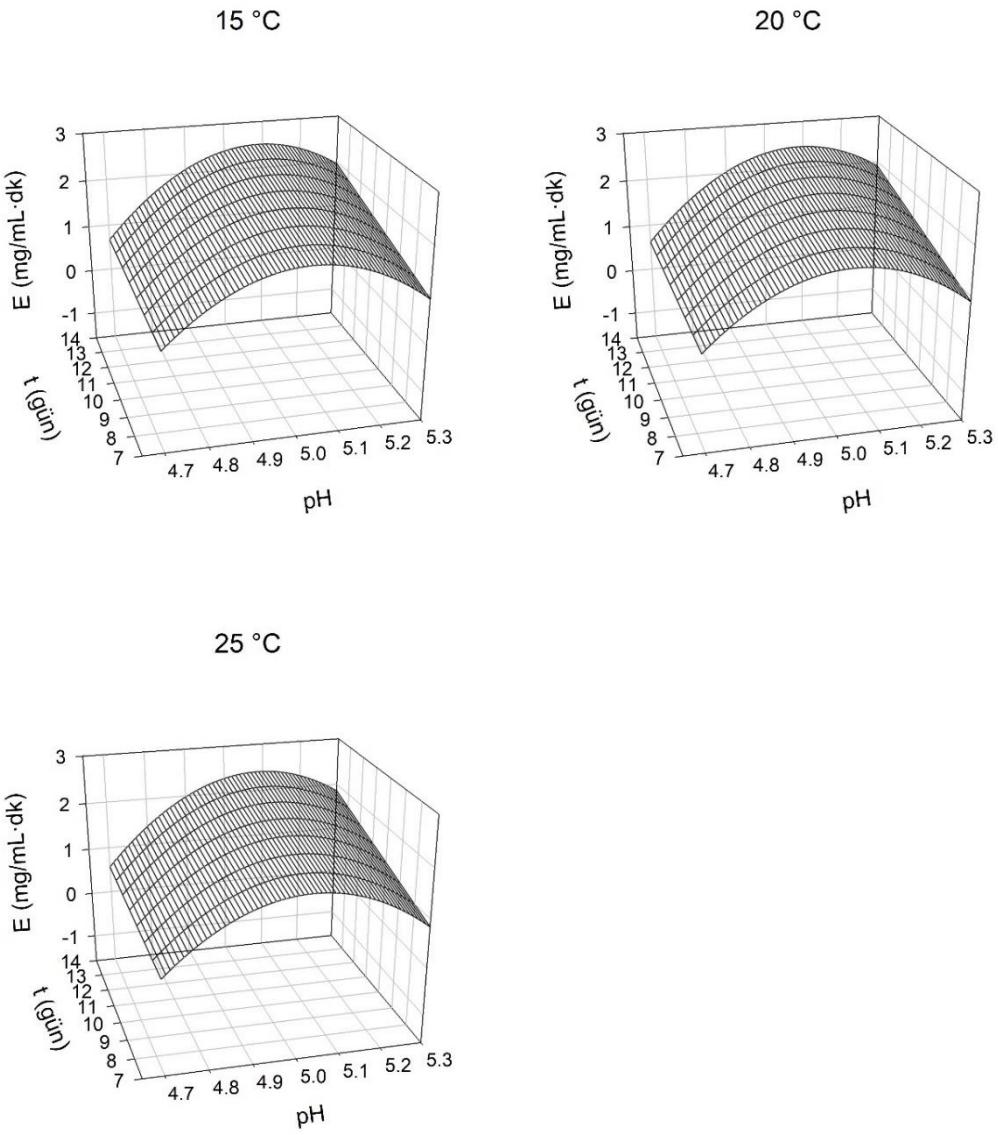
Şekil 4.2 *P. brevicompactum* suşu için Çizelge 4.11'de yer alan parametre değerleri kullanılarak 15, 20 ve 25 °C sıcaklıkta elde edilen üç boyutlu yüzeyler

Şekil 4.2'de 15, 20 ve 25 °C sıcaklıklar arasındaki farkı gözlemlemek çok mümkün olammıştır. Çünkü modelde sıcaklığa ait parametre istatistiksel olarak anlamsız çıkmıştır (Çizelge 4.10). Bu nedenle de her üç sıcaklıkta da benzer sonuçlar elde edilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi modelden tüm sıcaklıklar için pH 4.7'de ve 14 günde, en düşük enzim aktivitesi ise yaklaşık olarak pH 5'de (5.08) ve 7 günde hesaplanmıştır.



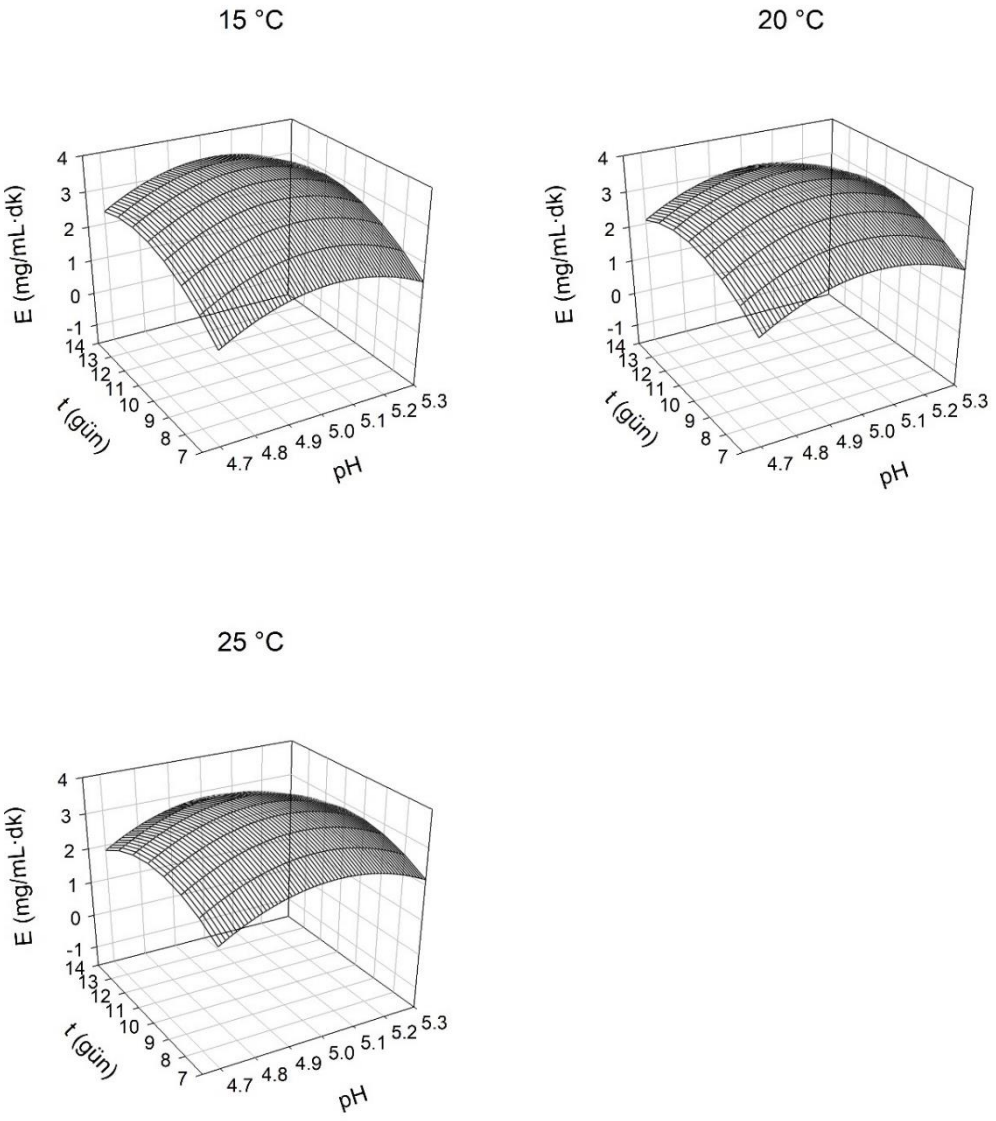
Şekil 4.3 *P. cavernicola* suşu için Çizelge 4.11'de yer alan parametre değerleri kullanılarak 15, 20 ve 25 °C sıcaklıkta elde edilen üç boyutlu yüzeyler

Benzer şekilde *P. cavernicola* suşu için de sıcaklıklar arasındaki fark gözlemlenememiştir (Şekil 4.3) ve en yüksek enzim aktivitesi tüm sıcaklıklar için pH 5.3'te ve 14 günde, en düşük proteaz enzim aktivitesi ise pH 4.7'de ve yaklaşık olarak 8 günde (8.3) hesaplanmıştır.



Şekil 4.4 *P. chrysogenum* suşu için Çizelge 4.11'de yer alan parametre değerleri kullanılarak 15, 20 ve 25 °C sıcaklıkta elde edilen üç boyutlu yüzeyler

P. chrysogenum suşu için de sıcaklıklar arasındaki fark gözlemlenememiştir (Şekil 4.4) ve en yüksek enzim aktivitesi tüm sıcaklıklar için yaklaşık pH 5'te (5.09) ve 14 günde, en düşük proteaz enzim aktivitesi ise pH 4.7'de ve 7 günde hesaplanmıştır.



Şekil 4.5 *P. corylophilum* suşu için Çizelge 4.11'de yer alan parametre değerleri kullanılarak 15, 20 ve 25 °C sıcaklıkta elde edilen üç boyutlu yüzeyler

Şekil 4.5'e göre *P. corylophilum* suşu için sıcaklıklar arasındaki farkı değerlendirmek mümkündür çünkü sıcaklık bu suş için anlamlı olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10). En düşük proteaz enzim aktivitesi tüm sıcaklıklar için pH 4.7 ve 7 günde, en yüksek enzim aktivitesi ise 15 °C'de yaklaşık pH 5'te (5.03) ve yaklaşık 12 günde (12.1); 20 °C'de yaklaşık pH 5'te (5.03) ve yaklaşık 11 günde (11.3); 25 °C'de yaklaşık pH 5'te (5.03) ve yaklaşık 11 günde (10.6) olarak hesaplanmıştır.

5. SONUÇLAR

Mikroorganizmalardan küflerin peynir üretiminde yüksek enzim aktivite özelliklerinden yararlanılır. Peynir üretiminde küflerin kültür olarak kullanılması gerçekleştirdikleri biyokimyasal reaksiyonlar, özellikle proteolitik ve lipolitik enzim aktiviteleri sonucunda peynirde tat-aroma oluşmasında büyük rol oynamaktadırlar.

Bu çalışmada Divle Obruğu Tulum Peyniri üretilmiştir ve olgunlaştırmadan kullanılarak proteaz enzimi aktivitesinde değerlendirmek için besi ortamı olarak kullanılmıştır. Kullanılan suşlardan elde edilen proteaz enzimi peynir endüstrisinde saf enzim olarak kullanılabilmesinin potansiyeli araştırılmıştır. Enzim aktivitesini incelemek için üç farklı parametre pH, T ve t olarak belirlenmiş ve her parametre için üç değer kullanılmıştır (pH: 4.7, 5.0, 5.3; T: 15, 20, 25 °C; t: 7, 11,14 gün). Peynirin doğal ortamından izole edilen (Ozturkoglu-Budak 2016a) *P. brevicompactum, P. covernicola, P. chrysogenum ve P. corylophilum* küf suşları peynir besiyerine inkübe edilerek elde edilen süpernatantlar kullanılarak proteaz enzim aktiviteleri tayin edilmiş ve aktivite değerleri ile üç boyutlu modellemeler yapılarak geri regresyon yöntemi ile anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar kullanılarak SDS-PAGE yöntemi ile proteaz enziminin proteinlerin parçalanmasındaki rolü molekül ağırlıklarından yola çıkılarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ve sonuçlara ait değerlendirmeler aşağıda listelenmiştir:

Proteaz Enzim Aktiviteleri Bakımından Genel Değerlendirme: Kullanılan suşların hepsinin iyi birer proteaz üreticisi olacağı düşünülmektedir.

- Kontrol olarak kullanılan peynir besiyerinin enzim aktivitesinin pH 5.3, 15 °C 14 günde en yüksek olduğu tespit edilmiştir. En düşük enzim aktivitesinin pH 5.3, 20 °C'de 11 günde tespit edilmiştir. Sonuçlara göre enzim aktivitesinin genel olarak en iyi olduğu süre 7. ve 14. günlerdedir. 7 günden 11 güne kadar sürede genel olarak artış halinde 11. günde azalma ve 14. günde artış halinde olduğu gözlenmiştir. Genel olarak süre arttıkça proteaz enzim üretiminin arttığı gözlenmiştir. 11. gündeki aktivitenin azalmasının diğer parametre değerlerinin etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

- *P. brevicompactum* suşunun enzim aktivitesinin pH 4.7, 25 °C 14 günde en yüksek olduğu tespit edilmiştir. En düşük enzim aktivitesinin pH 5.3, 15 °C'de 7 günde tespit edilmiştir. Sonuçlara göre enzim aktivitesinin genel olarak en iyi olduğu süre 14 gündür ve 7 günden 14 güne kadar olan sürede genel olarak artış halinde olduğu gözlenmiştir. Süre arttıkça proteaz enzim üretiminin arttığı belirlenmiştir.
- *P. cavernicola* suşunun enzim aktivitesinin pH 5.0, 15 °C 14 günde en yüksek olduğu tespit edilmiştir. En düşük enzim aktivitesinin pH 4.7, 25 °C'de 7 günde tespit edilmiştir. Sonuçlara göre enzim aktivitesinin genel olarak en iyi olduğu süre 14 gündür ve 7 günden 14 güne kadar olan sürede genel olarak artış halinde olduğu gözlenmiştir. Süre arttıkça proteaz enzim üretiminin arttığı belirlenmiştir.
- *P. chrysogenum* suşunun enzim aktivitesinin pH 5.0, 20 °C'de 14 günde en yüksek olduğu tespit edilmiştir. En düşük enzim aktivitesinin pH 4.7, 25 °C'de 11 günde tespit edilmiştir. Sonuçlara göre enzim aktivitesinin genel olarak en iyi olduğu süre 14 gündür ve 7 günden 14 güne kadar olan sürede genel olarak artış halinde olduğu gözlenmiştir. Süre arttıkça proteaz enzim üretiminin arttığı düşünülmektedir.
- *P. corylophilum* suşunun enzim aktivitesinin pH 5.0, 25 °C 11 günde en yüksek olduğu tespit edilmiştir. En düşük enzim aktivitesinin pH 4.7, 25 °C'de 7 günde tespit edilmiştir. Sonuçlara göre enzim aktivitesinin genel olarak en iyi olduğu süre 11 ve 14 gündür. 7 günden 14 güne kadar olan sürede genel olarak artış halinde olduğu gözlenmiştir. Süre arttıkça proteaz enzim üretiminin arttığı belirlenmiştir.
- Tüm suşların enzim aktivitelerinin genel değerlendirmesi yapıldığında en yüksek enzim aktivitelerinin 14. günde (*P. corylophilum* 11 günde*)* olduğu tespit edilmiştir. Süre parametrelerimiz olan 7, 11 ve 14 gün değerleri analiz edildiğinde genel olarak sıcaklık arttıkça enzim aktivitesinin arttığı sonucuna varılmıştır.
- Tüm suşların en yüksek aktivite gösterdiği pH 5 değeri olarak gözlenmiştir ve bu pH değerinin tüm suşlar için optimum parametre değeri olduğu sonucuna varılmıştır. Peynir üretiminde pH 5'te belirtilen küf suşlarının inoküle edilmesiyle olgunlaşmanın optimum olarak gerçekleşeceği düşünülmektedir.
- Sıcaklık parametresi değerlendirilirken suşların en yüksek aktivite gösterdiği değerlerde farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Önceki çalışmalara ve peynirin olgunlaştırıldığı doğal ortam koşullarına bakarak en düşük sıcaklık olan 15 °C'nin optimum koşulları sağlayacağı düşünülmektedir.

- Tüm suşlar arasında en yüksek enzim aktivite değeri *P. corylophilum* suşunda gözlenmiştir. Bu suşun 4 suş arasında en iyi proteaz enzimi üreticisi olduğu düşünülmektedir.

Matematiksel Modelleme Bakımından Genel Değerlendirme: Matematiksel modelleme ile tüm suşların enzim aktivite sonuçları üç boyutlu grafiklerle gösterilmiş olup modeller sonuçların optimizasyonu için yardımcı olmuştur. Grafiklerden elde edilen sonuçlar aşağıda değerlendirilmiştir:

- *P. brevicompactum* suşuna ait model grafiği incelendiğinde en yüksek aktivite değeri tüm sıcaklık değerleri için pH 4.7 değerinde ve 14 günde gerçekleştiği görülmüştür. Süre ve pH değeri olarak spektrofotometrik yöntemler ile elde edilen sonuç karşılaştırıldığında her iki sonuç da birbiriyle örtüşmektedir. Sıcaklıklar arasında anlamlı bir fark gözlenmediğinde değerlendirme yapmak mümkün olmamıştır.
- *P. cavernicola* suşuna ait model grafiği incelendiğinde en yüksek aktivite değeri tüm sıcaklık değerleri için pH 5.3 değerinde ve 14 günde gerçekleştiği gözlenmiştir. Süre olarak spektrofotometrik yöntemler ile elde edilen sonuç karşılaştırıldığında her iki sonucunda gün olarak 14 günde olduğu gözlenmiştir ve birbiriyle örtüşmektedir. Spektrofotometrik yöntemle elde edilen en yüksek aktivite sonucunun pH 5'te olmasının nedeni olarak anlamsız bulunan değerlerin model oluştururken çıkarılması sonucunda modelde en yüksek aktivitenin pH 5.3 bulunduğu düşünülmektedir. Sıcaklıklar arasında anlamlı bir fark gözlenmediğinden değerlendirme yapmak mümkün olmamıştır.
- *P. chrysogenum* suşuna ait model grafiği incelendiğinde en yüksek aktivite değeri tüm sıcaklık değerleri için pH 5.0 (yaklaşık 5.09) değerinde ve 14 günde gerçekleştiği gözlenmiştir. Süre ve pH değeri olarak spektrofotometrik yöntemler ile elde edilen sonuç karşılaştırıldığında her iki sonuç da birbiriyle örtüşmektedir. Sıcaklıklar arasında anlamlı bir fark gözlenmediğinden değerlendirme yapmak mümkün olmamıştır.
- *P. corylophilum* suşuna ait model grafiği incelendiğinde en yüksek aktivite değeri 15 °C için pH 5.0 (yaklaşık 5.03) değerinde ve 12 günde (yaklaşık 12.1), 20 °C için pH 5.0 (yaklaşık 5.03) değerinde ve 11 günde (yaklaşık 11.3), 25 °C için pH 5.0 (yaklaşık

5.03) değerinde ve 11 günde (yaklaşık 10.6) gerçekleştiği gözlenmiştir. Sıcaklık, pH ve süre değeri olarak spektrofotometrik yöntemler ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında her iki sonuç da birbiriyle örtüşmektedir. Ayrıca tüm suşlar arasında en yüksek enzim aktivitesi *P. corylophilum* suşunda görülmüştür ve modellemede tüm parametre değerleri için anlamlı sonuçların bu suşta olması da bu durumu kanıtladığı düşünülmektedir.

Molekül Ağırlıkları Bakımından Genel Değerlendirme: Suşların tüm parametre değerlerinin arasından seçilen enzim aktiviteleri en yüksek 8 verisi olanların molekül ağırlıklarının değerlendirmesinde SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır ve proteaz enzim aktivitelerinin bu yöntemle bulunan sonuçlara paralel olup olmadığı kontrol edilmiştir.

- En yüksek proteaz enzim aktivitesine sahip olan *Penicillium corylophilum* suşunun (pH 5.0, 25 °C, 14. gün) SDS-PAGE profili incelendiğinde bant oluşumlarının en düşük molekül ağırlıklarında oluştuğu gözlenmiştir. Bu durumun proteaz enzim aktivitesinin yüksek olduğu koşullarda proteinlerin parçalanması daha çok olduğundan daha küçük peptitler oluşmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu yöntemden elde edilen sonuç enzim aktivitesi ile paralellik göstermiştir.
- Analizi yapılan diğer parametre değerleri arasından en düşük proteaz enzim aktivitesine sahip olan *Penicillium cavernicola* suşunun (pH 5.0, 15 °C, 14. gün) SDS-PAGE profili incelendiğinde bant oluşumlarının diğerlerine kıyasla daha çok ve daha yüksek molekül ağırlıklarında oluştuğu gözlenmiştir. Bu durumun proteaz enzim aktivitesinin düşük olduğu koşullarda proteinlerin parçalanması daha az olduğundan daha büyük peptitler oluşmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu yöntemden elde edilen sonuç enzim aktivitesi ile paralellik göstermiştir.
- SDS-PAGE yöntemi ile bant oluşumları kıyaslandığında 8 farklı bant oluşumunun proteaz enzim aktivitesi en yüksek olanlardan en düşüğe doğru değerlendirilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi olanlarda bant oluşumu daha az ve daha küçük molekül ağırlıklarında, en düşük enzim aktivitesi olanlarda bant oluşumu daha çok ve daha büyük molekül ağırlıklarında olduğu gözlenmiştir. Proteaz enzim aktivitesinin yüksek olmasının proteinleri daha çok parçaladığı, enzim aktivitesinin düşük olması

proteinleri daha az parçaladığı anlamına geldiğinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda kullanılan, coğrafi işaretli yöresel bir peynirimiz olan Divle Obruğu Tulum peynirinden izole edilen saf küf suşlarından elde edilen proteaz enzimlerinin rennet enzimini destekleyici olarak peynir üretiminde kültür olarak ve biyoaktif peptit üretimi için kullanılması düşünülebilir. Ayrıca Araştırma sonucunda elde edilen verilerin birçok peynir çeşidinin olgunlaşmasında tat-aroma oluşumu için kullanılması ve geliştirilmesi için kaynak niteliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR

Abdel-Naeem, H. ve Mohamed, H.M. 2016. Improving the Physico-chemical and Sensory Characteristics of Camel Meat Burger Patties Using Ginger Extract and Papain. Meat Sci.118; 52-60.

Adetunji, A. ve Olaniran, A. 2020. Statistical modelling and optimization of protease production by an autochthonous *Bacillus aryabhattai* Ab15-ES: A response surface methodology approach. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 24; 101528.

Adrio, J.L. ve Demain, A.L. 2003. Fungal biotechnology. International Microbiology, 6; 191-199.

Adrio, J.L. ve Demain, A.L. 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. Biomolecules, 4(1); 117-139.

Aehle, W. 2004. Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 484.

Afşar, A., Gülümser, G., Mutlu, M.M. ve Özgünay, H. 2003. Enzimatik etki ile kromlu derilerdeki kırışıklıkların giderilmesi ve işlemin dayanım özellikleri üzerine etkilerinin araştırılması. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 40(2); 137-144.

Agrawal, D., Patidar, P., Banerjee, T. ve Patil, S. 2004. Production of alkaline protease by *Penicillium sp.* under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. Process Biochemistry, 39(8).

Akın, N. 2003. Peynirin olgunlaşmasında enzimlerden kaynaklanan proteoliz. Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi Dergisi, 3; 37-45.

Akkara, M. ve Tosun H. 2014. Funguslardan elde edilen endüstriyel ürünler. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 9(2); 46-53.

Akkaya, A. ve Pazarlıoğlu, N. 2014. 21. yüzyılın anahtar teknolojisi: Beyaz biyoteknoloji. Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi, 1(1); 22-33.

Alan, J.B., Fred, W. ve Neil, D.R. 2022. Handbook of Proteolytic Enzymes, Volume 1.

Alpan, L. 2008. Bazı Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkali Proteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.

Anbu, P., Gopinath, S., Chaulagain, B. ve Lakshmipriya, T. 2017. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2016. BioMed research international.

Aran, N. 2014. Enzimlerin Gıda Endüstrisinde Uygulama Alanları. Gıda Biyoteknolojisi; 107-118. Nobel Yayın Dağıtım 2.basım.

Arpana, M., Rathore, S., Rao, A., Nair, A., More, S. ve Fasim, A. 2023. Statistical bioprocess optimization for enhanced production of a thermo alkalophilic polygalacturonase (PGase) from *Pseudomonas sp.* 13156349 using solid substrate fermentation (SSF). Heliyon, 9(6).

Asar, R. 2016. *Bacillus megaterium* T50 izolatından izole edilen proteaz enziminin karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun.

Aslan, A. ve Sekin, Y. 1985. Besin Endüstrisinde Kullanılan Mikrobiyal Kaynaklı Enzimler. Gıda, (10)2; 377-388.

Ayvazoğlu, G. 2023. *Bacillus sp.* Suşlarından Proteaz Üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniveristesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.

Baweja, M., Tiwari, R., Singh, P.K., Nain, L. ve Shukla, P. 2016. An alkaline protease from *Bacillus pumilus* MP 27: functional analysis of its binding model toward its applications as detergent additive. Frontiers in microbiology, 7, 1195.

Bdewe Bdewe, S.A. 2020. Partial purification and characterization of protease enzymes from *Bacillus cereus*. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.

Benmrad, M., Moujehed, E., Elhoul, M., Mechri, S., Bejar, S., Zouari, R., . . . Jaouadi, B. 2018. Production, purification, and biochemical characterization of serine alkaline protease from *Penicillium chrysogenium* strain X5 used as excellent bio-additive for textile processing. International Journal of Biological Macromolecules, 119; 1002-1016.

Berikten, D. ve Kıvanç, M. 2021. Termofilik ve termotolerant filamentli fungus türlerinin endüstriyel öneme sahip enzim aktivitelerinin incelenmesi. Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma, 14(3); 427-430.

Bozlak, E. N. (2023). Cloning and expression of the *Pseudomonas sp KE38* extra-cellular protease gene in *E. coli*. Yüksek Lisans Tezi. İzmir Teknoloji Üniversitesi, İzmir.

Bullerman, L.B. 2003. Fungi in food–an overview. 5515.

Bulut, Ş. 2007. *Teredinobacter turnirae*'den Proteaz Üretiminde Farklı Stratejilerin Araştırılması. Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimi Dergisi, 19(4); 561-568.

Cherif, S., Mnif, S., Hadrich, F., Abdelkafi, S. ve Sayadi, S. 2011. A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. Lipids in health and disease, 10(1); 1-8.

Choudhary, R. 2004. Enzyme technology applications in leather processing. Indian J Chemistry Technology, 11; 659-671.

Claverie-Martin, F. ve Vega-Hernàndez, M. 2007. Aspartic Proteases Used in Cheese Making. In J. Polaina & A. P. MacCabe (Eds.), Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Dordrecht: Springer Netherlands.

Cogan, T. 2014. Starter cultures: Employed in Cheesemaking. In C. A. B. L. Tortorello (Ed.), Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). Oxford; Academic Press.

Çakmak, M. 2019. Ekstraselüler lipaz kaynağı olarak bazı mikrofungusların taranması ve katı substrat fermantasyonu ile enzim üretim koşullarının optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Çakmakçı, S., Cantürk, A. ve Çakır, Y. 2017. Peynir üretimi için sütü pıhtılaştıran enzimlere genel bir bakış ve güncel gelişmeler. Akademik Gıda, 15(4); 396-408.

Çelik, S. 2018. Çiğdem (Crocus Biflorus) Yumrularından Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Saflaştırılan Enzimin Kazeinin Koagülasyonunda Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Gıda, 43(2); 231-239.

da Silva, R., Ângelo, T. ve Cabral, H. 2013. Comparative evaluation of peptidases produced by *Penicillium corylophilum* and *Penicillium waksmanii* in solid state fermentation using agro-industrial residues. Journal of Agricultural Science and Technology. B, 3(3B)*;* 230.

De Vries, R.P., Burgers, K., Van de Vondervoort, P., Frisvad, J., Samson, R. ve Visser, J. 2004. A new black *Aspergillus* species, *A. vadensis*, is a promising host for homologous and heterologous protein production. Applied and environmental microbiology, 70(7); 3954-3959.

Değirmen, M. 2019. *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun proteaz üretim koşullarının optimizasyonu ve enzimin bazı özelliklerinin belirlenmesi.

Demir, S. 2020. Bacillus sp. EBTA6 ile proteaz üretiminin optimizasyonu ve enzimin endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.

Duran, K., Bozacı, E. ve Karahan, H.A. 2007. Protein esaslı mamüllerin enzimatik ön terbiyesi. Tekstil ve Konfeksiyon; 1-8.

Duran, K., Özdemir, D. ve Namlıgöz, E. 2007. İpek Liflerindeki Serisinin Enzimatik Olarak Uzaklaştırılması. Tekstil ve Konfeksiyon, 182-6.

El Soda, M., Madkor, S. ve Tong, P. 2000. Adjunct Cultures: Recent Developments and Potential Significance to the Cheese Industry. Journal of Dairy Science 83; 609-619.

Ellaiah, P., Srinivasulu, B. ve Adinarayana, K.A. 2002. A review on microbial alkaline proteases.

Erdoğan, B. 2020. *Bacillus Subtilis Megathirum* Bakteri Türünden Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Burdur Mehmet Akif Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sağlık ve Biyomedikal Bilimler Anabilim Dalı, Burdur.

Fankhauser, D.B. 2007. Fankhauser's Cheese Page. Enzyme biotechnology; 1-25.

Fitzgerald, P.M., McKeever, B.M., Van Middlesworth, J.F., Springer, J.P., Heimbach, J.C., Leu, C.T. ve Darke, P.L. 1990. Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0-A resolution. Journal of Biological Chemistry, 265(24); 14209-14219.

Fogarty, W.M. ve Kelly, C.T. 2012. Microbial enzymes and biotechnology. Springer Science and Business Media.

Fox, P. 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. Journal of Dairy Science 72*;* 1379-1400.

Fox, P., Guinee, T., Cogan, T. ve McSweeney, P. 2000. Fundamentals of Cheese Science. Gaithersburg.

Furhan, J. 2020. Adaptation, Production, and Biotechnological Potential of Cold-Adapted Proteases from Psychrophiles and Psychrotrophs: Recent Overview. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 18(1).

Gerze, A. 2003. Proteaz enziminin *bacillus subtilis megatherium* ve *bacillus polymxa* bakteri türlerinden kismi saflaştirilmasi ve özelliklerinin incelenmesi. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsi, İstanbul.

Ghafoori, H., Askari, M. ve Sarikhan, S. 2016. Purification and characterization of an extracellular haloalkaline serine protease from the moderately halophilic bacterium, *Bacillus iranensis* (X5B). Extremophiles, 20(2); 115-123.

Ghorai, S., Banik, S.P., Verma, D., Chowdhury, S., Mukherjee, S. ve Khowala, S. 2009. Fungal biotechnology in food and feed processing. Food Research International, 42(5-6); 577-587.

Gimenes, N.C., Silveira, E. ve Tambourgi, E.B. 2019. An Overview of Proteases: Production, Downstream Processes and Industrial Applications. Separation ve Purification Reviews, 50(3); 223-243.

Gomaa, A.M. 2018. Application of Enzymes in Brewing. J Nutri Food Sci Forecast 1(1); 1002.

Grbavčić, S., Bezbradica, D., Izrael-Živković, L., Avramović, N., Milosavić, N., Karadžić, I. ve Knežević-Jugović, Z. 2011. Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: compatibility study with detergent ingredients and washing performance. Bioresource Technology, 102(24); 11226-11233.

Gupta, R., Beg, Q. ve Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol, 59(1); 15-32.

Güldiken, M. 2022. Bazı ekstremofilik mikroorganizmalardan proteaz enzim izolasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

Gülmüş, E.Ö. ve Görmez, A. 2018. *Bacillus pumilus* NK14 izolatının proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi ve enzimin leke çıkarıcı etkisinin tespiti. International Journal of Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies, 2(2); 7-12.

Güngör, N. 2011. *Bacillus* Suşlarından Elde Edilen Proteaz Enziminin Optimizasyonu ve Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.

Güven Gülhan, Ü. 2014. Isolation, Partıial Purification and Characterization Of Xylanase, Protease, Lipase, Laccase and Alpha-Amylase Produced By Soil Bacteria. Yüksek Lisans Tezi. Fatih Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Haliskaranfil, S. 2012. Termoalkalifilik amilaz ve selülaz enzim (multi enzim) üreticisi *bacıllus sp.* izolasyonu, enzimlerin karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulanabilirliği. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Hammamchı, H. 2014. *Rhodotorula mucilaginosa*'dan lipaz üretimi ve aktivitesine etkili parametrelerin belirlenmesi. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Hastaoğlu, E., Erdoğan, M. ve Işkın, M. 2021. Gastronomi turizmi kapsamında Türkiye peynir çeşitliliği haritası. Atatürk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, 25(3); 1084-1113.

Hayaloğlu, A.A. ve Özer, B.H. 2011. Peynirde olgunlaşma . Peynir Biliminin Temelleri .Sidaş Medya, İzmir.

Inamuddin, A., Admed , M. ve Asiri , A. 2019. Enzymatic Fuel Cells Materials and Applications. Materials Research Forum LLC, Pennsylvania.

Iram, A., Cekmecelioglu, D. ve Demirci, A. 2022. Optimization of the fermentation parameters to maximize the production of cellulases and xylanases using DDGS as the main feedstock in stirred tank bioreactors. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Biotechnology, 45; 102514.

Jaouadi, N.Z., Rekik, H., Badis, A., Trabelsi, S., Belhoul, M., Yahiaoui, A.B. ve Jaouadi, B. 2013. Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin keratin biodegradation and hide-dehairing activities. PloS one, 8(10); e76722.

Johannes, T. ve Zhao, H. 2006. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. Current opinion in microbiology, 9(3); 261-267.

Karaman, S. 2023. Termofilik bakterilerden proteaz üretimi, saflaştırılması, karakterizasyonu ve endüstriyel uygulama potansiyellerinin belirlenmesi. Doktora Tezi. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Karmakar, S. 1999. Textile science and technology. Chemical technology in the pre-treatment processes of textiles 12; 3-44.

Kavanagh, K. 2011. Fungi Biology and Applications. John Wiley and Sons.

Kieliszek, M., Katarzyna, P., Kamil, P. ve Anna, M.K. 2021. Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. Molecules 2021, Vol. ,26(7); 1858 .

Kim, M., Si, J.B. ve Wee, Y.J. 2016. Identification of a newly isolated protease-producing bacterium *Bacillus subtilis* FBL-1 from soil. Microbiol. Biotechnol. Lett., 44; 185-193.

Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J. ve Lee, Y. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus sp.* strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. Applied and Environmental Microbiology, 62(7); 2482-8.

Kıran, E., Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N. 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9; 12-19.

Koç, Ö. 2015. *Aspergillus fumigatus* HBF125 ekstraselüler α-amilazının üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Koçak, C. 2015. Peynir Teknolojisi. Süt Teknolojisi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:1625, Ders Kitabı 577; 19. Ankara.

Korcan, E., Özkara, A., Akyıl , D., Ciğerci, İ. Konuk, M. 2007. Farklı fungus cinslerinde endüstriyel öneme sahip bazı enzim aktivitelerinin İncelenmesi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 7(1); 279-286.

Kudrya, V. ve Simonenko, I. 1994. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. Applied microbiology and biotechnology, 41(5); 505-9.

Kumar, C.G. ve Takagi, H. 1999. Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint. Biotechnology Advences, 17; 561-594.

Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227; 680-685.

M'hir, S., Manel, Z., Nadia, C. ve Moktar, H. 2014. Gluten Proteolysis as Alternative Therapy for Celiac Patients: A Mini-Review. African Journal of Biotechnology 11(29); 7323–30.

Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G. ve Kikuchi, H. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. Nature, 438(7071); 1157-1161.

Mavituna, F. ve Sinclair, C. 2008. Modelling the kinetics of biological activity in fermentation systems. Practical Fermentation Technology. John Wiley and Sons Ltd Chichester;167-230, UK.

McDonald, A.G. Tipton, K.F. 2023. Enzyme nomenclature and classification: The state of the art. The FEBS journal, 290(9); 2214-2231.

McSweeney, P. 2004. Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview. In McSweeney, P. L. H, Cogan, T.M., Fox P.F. & Timothy P. G. (Eds.),. *C*heese:Chemistry, Physics and Microbiology, Vol 1: General Aspects; 347-360. London; Elsevier.

McSweeney, P. ve Sousa, M. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. Lait 80; 293-324.

Modler, H. 1985. Functional Properties of Nonfat Dairy Ingredients-A Review. Modification of Products Containing Casein. J Dairy Sci, 68(9); 2195-2205.

Nahar, S., Mizan, M. R., Ha, A. ve Ha, S.D. 2018. Advances and future prospects of enzyme- based biofilm prevention approaches in the food industry. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 17(6); 1484-1502.

Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z. ve Amjad, F. 2020. Protease-A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. Catalysis Letters, 151(2); 307-323.

Neves, A., Pool, W., Solopova, A., Kok, J., Santos, H. ve Kuipers, O. 2010. Towards enhanced galactose utilization by *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology 76; 7048-7060.

Okpara, M.O. 2022. Microbial enzymes and their applications in food industry: a mini-review. Advances in Enzyme Research 10(1); 23-47.

Ozturkoglu Budak, S., Figge, M., Houbraken, J. ve De Vries, R. 2016a. The diversity and evolution of microbiota in traditional Turkish Divle. International Dairy Journal 58; 50-53.

Ozturkoglu Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P. ve De Vries, R. 2016b. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. International Journal of Food Microbiology, 237; 17-27.

Özcan, K. ve Çorbacı, C. 2017. *Streptomyces sp.* K22 ve K30 suşlarından lipaz ve proteaz enzim üretimi. Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi, 7(2); 128-135.

Özcan, D. 2015. Endüstriyel kullanıma uygun, termostabil rekombinant alfa amilaz ve beta amilaz enzimlerinin eş zamanlı bakteriyel ekspresyon ile

üretilmesi.Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Yüzüncü yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.

Özden, S. 2014. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den proteaz enziminin saflaştırılması, aktivitesinin tayini ve karakterizasyonu . Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Özgören, E. ve Seçkin, A. 2012. Türkiye'de Ticari Ölçekte Üretilen Bazı Küflü Peynirlerin Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Akademik Gıda, 10(2); 55-62.

Özkan, E. 2010. Fungal kaynaklı proteaz üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Öztürkoğlu Budak, Ş. 2016. Dynamics of complex microbiota and enzymes in Divle Cave cheese and their biochemical consequences. Doctoral dissertation, Utrecht University, 27-28.

Pant, G., Prakasha, A., Pavania, J., Bera, S., Deviram, G., Kumar, A., . . . Prasuna, R.G. 2014. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. Journal of Taibah University for Science, 9(1); 50-55.

Parente, E. ve Cogan, T. 2004. Starter cultures: General aspects. In P. L. H. M. T. M. C. Patrick F. Fox & P. G. Timothy (Eds.). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (s. Vol. Volume 1, pp. 123-147). Academic Press.

Polgar, L. 1989. Mechanisms of protease action. CRC press.

Prakasham, R.S., Rao, C.S. ve Sarma, P.N. 2006. Green Gram Husk-An Inexpensive Substrate for Alkaline Protease Production by *Bacillus sp.* in Solid-state Fermentation. Bioresour Technol. 97; 1449-1454.

Qureshi, M.A., Khare, A.K. ve Pervez, A. 2015. Enzymes used in dairy industries. Int. J.Appl. Res., 1(10); 523-527.

Rai, S.K. ve Mukherjee, A.K. 2010. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. Biochemical Engineering Journal, 48; 173-180.

Rao, M., Tanksale, A., Ghatge, M. ve Deshpande, V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and molecular biology reviews, 62(3); 597-635.

Rawlings, N.D. 2013. Protease Families, Evolution and Mechanism of Action. In Proteas Structure and Function, 1st ed.; Brix, K., Stöcker, W., Eds.; Springer-Verlag Wien: Vienna,Austria; 1-36.

Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A. ve Ashraf, M. 2019. Microbial proteases applications. Front. Bioeng. Biotechnol., 7; 110.

Roy, S. ve Kumar, V. 2014. A practical approach on SDS PAGE for separation of protein. International Journal of Science and Research, 3(8); 955-960.

Salleh, A., Razak , C., Rahman , R. ve Basri , M. 2006. New Lipases and Proteases. Nova Science Publishers, 23-39. New York.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Press. NY.

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. ve Pandey, A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry, 40; 2689-2694.

Saravanamuthu, R., Dubey, R.C. ve Maheshwari, D.K. 2010. Industrial Exploitation of Microorganisms. I.K. International Publishing House; 227-235.

Sargın, S. ve Öngen, G. 2003. Kanatlı yemi katkısı olarak kullanılan ksilanaz enziminin katı kültür fermantasyon yöntemi ile üretiminde ölçek büyütme çalışmaları. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 40(3).

Sayedi, S.S. 2021. Isıya dirençli küflerin amilaz, lipaz ve proteaz enzimlerini üretme yeteneklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisanüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

Seri, M. 2020. Konya küflü peynirinden izole edilen küflerin moleküler identifikasyonu ve *Penicillium roqueforti* izolatlarının morfolojik karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı.

Sevinç, N. 2010. Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus Sp.* Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

Sharma, K., Kumar, R., Panwar, S. ve Kumar, A. 2017. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 15(1); 115-126.

Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A. ve Kumar, A. 2019. A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. Industrial Biotechnology, 15(2); 69-78.

Si, J.B., Jang, E.J., Charalampopoulos, D. ve Wee, Y. 2018. Purification and characterization of microbial protease produced extracellularly from *Bacillus subtilis* FBL-1. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 23; 176-182.

Singh, R., Chauhan, K., Kaur, K. ve Pandey, A. 2020. Statistical optimization of solid-state fermentation for the production of fungal inulinase from apple pomace. Bioresource Technology Reports, 9; 100364.

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. ve Mehta, P. 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech 6(2); 174.

Singh, R., Mittal, A., Kumar, M. ve Mehta, P. 2016. Microbial proteases in commercial applications. J Pharm Chem Biol Sci 4.3; 365-374.

Souza, P.M., Bittencourt, M.A., Caprara, C.F., Freitas, M., Almeida, R.C., Silveira, D., . ..Magalhaes, P.O. 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. Brazilian Journal of Microbiology, 46(2); 337-346.

Souza, T., de Andrade, C., Koblitz, M. ve Fai, A. 2022. Microbial peptidase in food processing: Current state of the art and future trends. Catalysis Letters, 153(1); 114-137.

Srilakshmi, J., Madhavi, J., Lavanya, S. ve Ammani, K. 2015. Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 2(4); 218-234.

Steinkuhler, C. 2008. Viral Proteases. In: encyclopedia of molecular pharmacology, Offermanns, S., Rosenthal, W. (eds.). International Publishing, Berlin.

Stryer, L. 1981. Biochemistry. Freeman, San Francisco.

Sumantha, A., Larroch, C. ve Pandey, A. 2006. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases. Food Technol. Biotechnol. 44 (2); 211-220.

Şahin, İ. ve Korukluoğlu, M. 2000. Küf-Gıda-İnsan. Vipaş A.Ş, Bursa.

Tanksale, A.M. 2001. Molecular aspects of a fungal alkaline protease. Ph.D.Thesis. University of Pune, India.

Tekin, N. 2008. Türkiye Kaynaklı B*acillus spp.*'lerin Alkalen Proteaz ÜretimKapasiteleri ve Enzimlerin Kısmen Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.

Temel, L. 2015. *Bacillus sp*. P22 Alkalen Proteazının Üretim Koşullarının Optimizasyonu , Enzimin Saflaştırılması ve Nitelendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gebze.

Tolan,M. 2015. Mikrobiyal Kökenli Proteaz Üretimi, Saflaştırılması veKarakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik AnaBilim Dalı, Tokat.

Topal, Ş. 1985. Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'nin Yeri. Gıda, 10(1); 377-388.

Uçar, A. 2011. *Aspergillus sp.* tarafından üretilen amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasıyonu. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Uyanık, A. 2008. Beta-galaktosidaz enziminin mikrobiyal hücrelerden izolasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Vilar, D., Fernandes, C., Nascimento, V., Torres, N., Leite, M., Bharagava, R., . . . Ferreira, L. 2021. Hyper-production optimization of fungal oxidative green enzymes using citrus low-cost byproduct. Journal of Environmental Chemical Engineering, 9(1); 105013.

Vishwanatha, K.S., Rao, A. ve Singh, S.A. 2009. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. Food Chem., 114; 402-407.

Vranova, V., Rejsek, K. ve Formanek, P. 2013. Proteolytic activity in soil: a review. Applied Soil Ecology, 70; 23-32.

Vranova, V., Rejsek, K. ve Formanek, P. 2013. Proteolytic activity in soil:A review. Applied Soil Ecology, 70; 23-32.

Vural, H. ve Öztan, A. 1996. Et ve Ürünleri Kalite Kontrol Laboratuvarı Uygulama Klavuzu: H.Ü. Müh. Fak. Yayın No:36. Ankara.

Wahab, W., Mostafa, F., Ahmed, S. ve Saleh, S. 2023. Statistical optimization of enzyme cocktail production sing Jew's mallow stalks residues by a new isolate *Aspergillus flavus* B2 via statistical strategy and enzymes characterization. Journal of Biotechnology, 367; 89-97.

Wang, B., Wu, W. ve Liu, X. 2007. Purification and characterization of a neutral serine protease with nematicidal activity from *Hirsutella rhossiliensis*. Mycopathol., 163; 169-176.

Wang, S.L., Chao, C.H., Liang, T.W. ve Chen, C.C. 2009. Purification and characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and conversion of marine wastes by these enzymes. Marine biotechnology, 11(3); 334-44.

Ward, O. 1985. Proteolytic enzymes.

Wen, Y., Qiang, J., Zhou, G., Zhang, X. ve Wang, L. 2022. Characterization of redox and salinity-tolerant alkaline protease from *Bacillus halotolerans* strain DS5. Front Microbiol, 13; 935072.

Woodey, J.M. 2000. Advances in enzyme technology-UK contributions. History of Modern Biotechnology II; 93-108.

Yadav, A.N., Singh, S., Mishra, S. ve Gupta, A. 2019. Recent advancement in whitebiotechnology through fungi: perspective for value-added products and environments. Springer International Publishing, New York, USA.

Yenigün, B. 2000. Domates Filizinden Asit Fosfatazın Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İ.T.Ü, İstanbul.

Yetim, H. ve Çakmakçı, S. 1997. Küfle Olgunlaştırılan Bazı Bitkisel ve Hayvansal Gıdalar. Gıda, 22(4); 279-285.

Yvon, M. ve Rijnen, L. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. International Dairy Journal 11; 185-201.

Zambare, V., Nilegaonkar, S. ve Kanekar, P. 2011. A novel extracellular proteasefrom *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. New biotechnology, 28(2); 173-181.