

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

***Lactococcus lactis* spp. *lactis* (NRRL-1821) KAYNAKLI**
DİPEPTİDİL PEPTİDAZ IV ENZİMİNİN KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEVDA ARISOY

DENİZLİ, OCAK - 2016

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



Lactococcus lactis spp. *lactis* (NRRL-1821) KAYNAKLI
DİPEPTİDİL PEPTİDAZ IV ENZİMİNİN KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEVDA ARISOY

DENİZLİ, OCAK - 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sevda ARISOY tarafından hazırlanan "*Lactococcus lactis* spp. *lactis* (NRRL-1821) KAYNAKLI DİPEPTİDİL PEPTİDAZ IV ENZİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 15.01.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

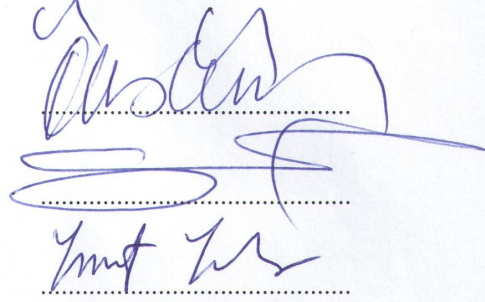
Jüri Üyeleri

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Özlem AYTEKİN


Üye
Prof. Dr. Sebahattin NAS

Üye
Prof. Dr. Yusuf YILMAZ

İmza



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24.02.2016 tarih ve ...08/21... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Orhan KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 113Z841 nolu proje ve BAP tarafından 2015-FBE032 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

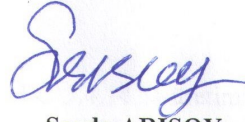
Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHÜRLEME İÇİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI İYİ ÖĞRENCİLERİN)

SEVDA ARISOY



Sevda ARISOY

ÖZET

***Lactococcus lactis* spp. *lactis* (NRRL-1821) KAYNAKLI DİPEPTİDİL
PEPTİDAZ IV ENZİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SEVDA ARISOY
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. ÖZLEM AYTEKİN)

DENİZLİ, OCAK - 2016

Bu çalışmada, Dipeptidil peptidaz IV enziminin (DPP IV, EC 3.4.14.5) üretimi saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır. Dipeptidil peptidaz IV enzimi tüm doku, organ ve sistemlerin düzenlenmesinde rol alan, nörolojik, immünolojik ve gastroenterolojik açıdan araştırılan önemli bir enzimdir. Enzimin üretiminde *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşu kullanılmıştır. Üretim için kullanılan inokülasyon oranı %5 olarak belirlenmiştir. Üretim sonrasında hücreler sonikasyon ile parçalanmış, sonikasyon işlemi optimize edilmiş ve optimum parçalama parametreleri 28 dakika, %91 güç ve döngü 3 olarak belirlenmiştir. Parçalama işlemi ile hücre dışına çıkarılan enzime ultrafiltrasyon ve %70 amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Ön işlemleri yapılan enzim iyon değiştirici kolon ve jel filtrasyon kolonundan geçirilerek %59,29 oranında saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi sonucunda spesifik aktivite 11151,154 mU/mg, verim %6,9 ve saflaştırma katsayısı 22,54 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE analizi ile saflığı, kütle spektrometrisi ile peptit dizilişi ve molekül ağırlığı belirlenmiştir. DPP IV enziminin molekül büyüklüğü 87,58 kDa olarak bulunmuştur. DPP IV enziminin kinetik özelliklerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar sonucunda optimum sıcaklık 40°C ve optimum pH 8,0 olarak bulunmuş; spesifik substrat Gly-Pro-pNA olarak belirlenmiş; EDTA, PMSF, Mg⁺², Ca⁺², Fe⁺², Zn⁺², Hg⁺² iyonları ve Gly-Pro-Phe, Gly-Pro-Ile, Phe-Val-Val-Asn-Ala peptit dizileri kullanılarak inhibisyon mekanizmaları çalışılmış Hg⁺², Zn⁺² ve Ca⁺² iyonlarının en yüksek inhibitör etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan enzim ticari enzimlerle kıyaslanmış ve saflaştırılan enzimin enzim aktivitesinin en yüksek aktiviteye sahip ticari enzimin 14,32 katı olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre *Lactococcus lactis* spp. *lactis*'ten elde ettiğimiz ve saflaştırdığımız DPP IV enzimi ticari enzimlerle rekabet edebilecek düzeyde bir enzim aktivitesine sahip bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELEER: Dipeptidil peptidaz IV, protein saflaştırma, enzim kinetiği

ABSTRACT

DETERMINATION OF KINETIC PROPERTIES OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV ENZYME FROM *Lactococcus lactis* spp. *lactis*

MSC THESIS

SEVDA ARISOY

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR:ASSIST. PROF. DR. ÖZLEM AYTEKİN)

DENİZLİ, JANUARY 2016

In this study, production, purification and partial characterization of Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV, EC 3.4.14.5) enzyme were performed. Dipeptidyl peptidase IV is an important enzyme that involve in the regulation of all tissues, organs and systems. The enzyme has been investigated neurological, immunological and gastroenterological studies. *Lactococcus lactis* spp. *lactis* strains were used for the enzyme production. Inoculation ratio was determined as 5%. After production, the cells were disrupted by sonication. Optimized sonication parameters were found as 28 min, 3 cycle and power 91%. Ultracentrifugate and ammonium sulfate precipitation (70%), ion exchange column and gel filtration column were performed to extracted enzyme. As a result of the purification process, specific activity of the enzyme, yield and purification fold was 11151,154 mU/mg, 6,9% and 22.54, respectively. The molecular weight of the enzyme was 87,58 kDa and the purity was calculated as 59.29%. The optimum temperature value was measured as 40°C and optimum pH value was found as 8.0. As a specific substrate Gly-Pro-pNA had more affinity to the enzyme than Ala-Pro-pNA. Inhibition mechanisms were conducted by using EDTA, PMSF, Mg⁺², Ca⁺², Fe⁺², Zn⁺², Hg⁺² ions and Gly-Pro-Phe, Gly-Pro-Ile, Phe-Val-Val-Asn-Ala peptide sequences. Hg⁺², Mg⁺² and Ca⁺² ions were have the highest inhibitor effect. The purified enzyme was compared with commercial enzymes, and the enzyme activity of purified DPP IV enzyme was found to be 14,32 times higher than the commercial enzyme, which has the highest DPP IV activity. As a result of the study, partially purified DPP IV enzyme from *Lactococcus lactis* spp. *lactis* can be compare able to commercial enzymes in term of the enzyme activity.

KEYWORDS: Dipeptidyl peptidase IV, protein purification, enzyme kinetic

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL, BİRİM VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. ENZİMLER	3
2.1 Enzimlerin Sınıflandırılması	3
2.2 Dipeptidil peptidaz IV (DPP IV) enzimi	4
2.3 <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> bakterisi	6
2.4 Enzim saflaştırması ve karakterizasyonu	7
2.5 Enzim kinetiği	8
2.6 Enzim inhibisyonları	9
3. MATERYAL- METOT	14
3.1 Materyal.....	14
3.1.1 Saf kültür.....	14
3.1.2 Besi ortamları.....	14
3.2 Metot	14
3.2.1 Saf kültürün üretime hazırlanması	14
3.2.2 Saf kültürün dondurulması ve muhafazası.....	15
3.2.3 Mikroorganizmaların inokülasyon oranlarının belirlenmesi	15
3.2.4 Mikroorganizmaların üretimi.....	16
3.2.5 OD ₆₆₀ -koloni oluşturan birim/mL (kob/ mL) korelasyonu	16
3.2.6 Hücre hasatı	16
3.2.7 DPP IV enzim aktivitesinin ölçülmesi ve standart eğri çizimi	17
3.2.8 Protein miktarı ölçümü	19
3.2.9 DPP IV enzimin saflaştırılması.....	21
3.2.9.1 Sonikatör ile hücre parçalanması ve optimizasyonu	21
3.2.9.2 Santrifügal filtrasyon (Ultrafiltrasyon)	24
3.2.9.3 Amonyum sülfat çöktürmesi	24
3.2.9.4 Diyaliz	26
3.2.9.5 Kolon kromatografileri.....	26
3.2.9.5.1 Hiprep 16/10 Q FF Sepharose kolonu	27
3.2.9.5.2 Hiprep 16/60 S300 HR Sephacryl kolonu	27
3.2.10 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi.....	28
3.2.11 Kütle Spektrometrisi ile Protein Kimlik Tayini.....	31
3.2.12 Enzim karakterizasyonu.....	32
3.2.12.1 DPP IV enziminin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi .	32
3.2.12.2 DPP IV enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi	32
3.2.12.3 Enzim substrat spesifikliği	33
3.2.12.4 Enzim inhibisyonu	33
3.2.13 Ticari enzimlerin enzim aktivitelerinin kontrolü	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	35

4.1	Mikroorganizmaların inokülasyon oranlarının belirlenmesi	35
4.2	OD ₆₆₀ -kob/mL korelasyonu (Lineer regresyon analizi)	40
4.3	Sonikatör ile hücre parçalanması optimizasyonu	41
4.4	Santrifügal filtrasyon (Ultrafiltrasyon).....	46
4.5	Amonyum sülfat çöktürmesi	46
4.6	Kolon kromatografileri	48
4.7	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE).....	50
4.8	Enzim karakterizasyonu	56
4.8.1	Optimum çalışma sıcaklığın belirlenmesi.....	56
4.8.2	Optimum çalışma pH belirlenmesi	57
4.8.3	Enzim substrat spesifikliğı.....	58
4.8.4	Enzim inhibisyonları.....	59
4.9	Ticari Enzim Denemeleri	67
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	69
6.	KAYNAKLAR.....	71
7.	ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: DPP IV enziminin inkretin hormonlar üzerine etkisi	4
Şekil 2.2: Opioid peptit olan kazomorfin ve gluteomorfin yapılarının hidrolizi	5
Şekil 2.3:DPP IV enziminin katalitik etkisi	6
Şekil 2.4: <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> suşuna ait Gram boyama görüntüsü....	7
Şekil 2.5: Michaelis-Menten grafiği	8
Şekil 2.6: Lineweaver-Burk grafiği.....	9
Şekil 2.7: Yarışmalı inhibisyon mekanizması.....	10
Şekil 2.8: Yarışmalı inhibisyona ait Michaelis-Menten grafiği.....	11
Şekil 2.9: Yarışmasız inhibisyon mekanizması	11
Şekil 2.10: Yarışmasız inhibisyona ait Michaelis-Menten grafiği.....	12
Şekil 2.11: Yarışmayan inhibisyon mekanizması	12
Şekil 2.12: Yarışmayan inhibisyona ait Michaelis-Menten grafiği	13
Şekil 3.1: p- nitroaniline standart eğrisi	19
Şekil 3.2: Protein konsantrasyonu için kullanılan lineer regresyon eğrisi	20
Şekil 3.3: FPLC cihazı (Akta-Prime, GE, ABD)	26
Şekil 3.4: ‘My Image Analysis’ programına ait ekran görüntüsü.....	30
Şekil 4.1: %1’lik inokülasyon sonucunda <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> suşunun zamana göre OD değişimi	36
Şekil 4.2: % 2’lik inokülasyon sonucunda <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> suşunun zamana göre OD değişimi.....	37
Şekil 4.3: % 5’lik inokülasyon sonucunda <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> suşunun zamana göre OD değişimi	38
Şekil 4.4: % 10’luk inokülasyon sonucunda <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> suşunun zamana göre OD değişimi	39
Şekil 4.5: OD ₆₆₀ değişimine karşı hücre sayısının lineer regresyon eğrisi	41
Şekil 4.6: RSM eşitliği için düzeltme faktörü.....	43
Şekil 4.7: Zaman, güç ve enzim aktivitesi için 3 boyutlu grafik.....	44
Şekil 4.8: Zaman, döngü ve güç değişkenlerinin pertürbasyon grafiği.....	45
Şekil 4.9: Hiprep 16/10 Q FF sepharose kolonunun kromotogramı	48
Şekil 4.10: Hiprep 16/60 S300 HR Sephacryl kolonunun kromotogramı	49
Şekil 4.11: Saflaştırma basamaklarına ait SDS Page jel elektroforezi görüntüsü	51
Şekil 4.12: My Image Analysis (v2.0) yazılımı ile veri analizi	51
Şekil 4.13: Standart molekül büyüklüğü eğrisi	52
Şekil 4.14: DPP IV proteininin kütle spektrofotometrisi kullanarak proteomik doğrulanması	53
Şekil 4.15: DPP IV enziminin protein dizilimi	54
Şekil 4.16: <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> ’den saflaştırılan DPP IV enzimi aktivitesi-sıcaklık grafiği.....	57
Şekil 4.17: <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> ’den saflaştırılan DPP IV enzimi aktivitesi- pH grafiği	57
Şekil 4.18: Gly-Pro-pNA substratına ait Michaelis –Menten grafiği	58
Şekil 4.19: Gly-Pro-pNA substratına ait Lineweaver-Burk grafiği	58
Şekil 4.20: Ala-Pro-pNA substratına ait Michaelis-Menten grafiği	59
Şekil 4.21: Ala-Pro-pNA substratına ait Lineweaver-Burk grafiği	59

Şekil 4.22: Gly- Pro-Phe inhibitörüne ait Michaelis-Menten grafiği.....	59
Şekil 4.23: Gly- Pro-Phe inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği.....	60
Şekil 4.24: Gly- Pro-Ile inhibitörüne ait Michaelis-Menten grafiği	60
Şekil 4.25: Gly- Pro-Ile inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği.....	60
Şekil 4.26: Phe-Val-Val-Asn-Ala inhibitörüne ait Michaelis - Menten grafiği	61
Şekil 4.27: Phe-Val-Val-Asn-Ala inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği...	61
Şekil 4.28: PMSF inhibitörüne ait Michaelis - Menten grafiği.....	61
Şekil 4.29: PMSF inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği.....	62
Şekil 4.30: EDTA inhibitörüne ait Michaelis Menten grafiği.....	62
Şekil 4.31: EDTA inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği	62
Şekil 4.32: Ca inhibitörüne ait Michaelis - Menten grafiği	63
Şekil 4.33: Ca inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği	63
Şekil 4.34: Hg inhibitörüne ait Michaelis Menten grafiği	63
Şekil 4.35: Hg inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği	64
Şekil 4.36: Fe inhibitörüne ait Michaelis Menten grafiği	64
Şekil 4.37: Fe inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği.....	64
Şekil 4.38: Zn inhibitörüne ait Michaelis Menten grafiği.....	65
Şekil 4.39: Zn inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği	65
Şekil 4.10: Mg inhibitörüne ait Michaelis Menten grafiği.....	65
Şekil 4.41: Mg inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği	66

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1 Tris tamponu kullanarak hazırlanan p- nitroaniline konsantrasyonları .	18
Tablo 3.2 BCA protein içeriği analizi için hazırlanan BSA konsantrasyonları	20
Tablo 3.3 Çalışma sıklığı seviyeleri (Pulsed cycle değeri)	22
Tablo 3.4 Sonikasyon işleminin optimizasyonunda kullanılan deneysel dizayn değişkenleri (süre, güç, döngü) seviyeleri.....	22
Tablo 3.5 Amonyum sülfat çöktürmesi tablosu	25
Tablo 3.6 SDS –PAGE için ayırma jeli içeriği	29
Tablo 3.7 SDS –PAGE için ön ayırma jeli içeriği	35
Tablo 3.8 Piyasada satışı yapılan ticari enzimler ve kaynakları	34
Tablo 4.1 %1’lik inokülasyon oranında <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> suşunun büyüme kinetiği verileri	35
Tablo 4.2 %2’lik inokülasyon oranında <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> suşunun büyüme kinetiği verileri	36
Tablo 4.3 %5’lik inokülasyon oranında <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> suşunun büyüme kinetiği verileri	38
Tablo 4.4 %10’luk inokülasyon oranında <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> suşunun büyüme kinetiği verileri	39
Tablo 4.5 OD ₆₆₀ değişimine karşı hücre sayısı değerleri	40
Tablo 4.6 BBD tasarımı için kullanılan faktörlerin değerleri	41
Tablo 4.7 BBD tasarımı göre faktör seviyeleri ve yanıtları	42
Tablo 4.8 Varyans analizi tablosu	43
Tablo 4.9 İstatistiksel optimizasyon sonuçlarına karşılık sistemin verdiği parametreler, tahmini enzim aktivitesi değerleri ve analiz sonuçları ..	45
Tablo 4.10 DPP IV enziminin amonyum sülfat tuzu ile çöktürme oranları ve enzim aktivitesi sonuçları.....	47
Tablo 4.11. Saflaştırma basamakları sonuçları	50
Tablo 4.12 Standart molekül büyüklüğüne eğrisine ait bilgiler	52
Tablo 4.13 Sütun ve bantların analizi (Sütun 4)	52
Tablo 4.14 Sütun ve bantların analizi (Sütun 6)	52
Tablo 4.15 Kütle spektrofotometrisi analiz sonuçları özet tablosu.....	55
Tablo 4.16 İnhibitörlere ait K _m , V _{max} değerleri ve inhibisyon türü bilgileri	67
Tablo 4.17 Ticari enzim örnekleri, toplam enzim aktivitesi değerleri.....	67

SEMBOL, BİRİM VE KISALTMALAR LİSTESİ

g	:	Gram
kob	:	Koloni oluşturan birim
min	:	Dakika
mL	:	Mililitre
M	:	Molar
mM	:	Milimolar
µL	:	mikrolitre
OD	:	Optik yoğunluk
U	:	Enzim ünite
V_{max}	:	Maksimum reaksiyon hızı
K_m	:	Michaelis-Menten sabiti
S	:	Substrat
UV	:	Ultraviyole
Rcf	:	Relatif santrifüj kuvveti

ÖNSÖZ

Bu çalışmaya destek veren Türkiye Teknolojik ve Bilimsel Araştırmalar Kurumu ile Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, yüksek lisans eğitimim boyunca destek veren ve yönlendiren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Özlem AYTEKİN'e, çalışmalarım için gerekli olanakları sağlayan Yrd. Doç. Dr. Ali Özhan AYTEKİN'e ve Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığına, laboratuvardaki çalışma arkadaşlarıma ve eğitim hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Enzimler tıp, eczacılık, çevre, tarım, gıda gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Kıran ve ark 2006). Dünyada, 1980-1983 yılları arasında sadece 300 küçük biyoteknoloji şirketi çalışma yaparken, bu sayı 1985 yılında sadece Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) 400 düzeyine ulaşmıştır. 2006 yılında A.B.D.'de 900, bütün dünyada ise yaklaşık 1200 biyoteknoloji şirketi çalışmalarını çeşitli alanlarda sürdürmektedirler. 2010 yılında biyoteknoloji alanındaki AR-GE(Araştırma ve Geliştirme) çalışmaları için harcamalarının %39'u ABD tarafından yapılmıştır. Biyoteknoloji kaynaklı çalışmalar A.B.D.'de odaklanmış olmakla birlikte, günümüzde Japonya ve Kanada, biyoteknolojiyi (özellikle moleküler biyoteknolojiyi) stratejik alan kategorisinde değerlendirerek, özel şirketlerin yanı sıra, hükümetler düzeyinde destekleme ve geliştirme kararı almışlardır. Birçok ülkede olduğu gibi Türkiye'de de biyoteknoloji çalışmaları stratejik çalışmalarda öncelikli alanlardan biri olarak görülmektedir. Gıda ürünlerinden yoğurt, peynir, maya şarap ve bira bazında bakıldığında biyoteknoloji uygulamalarının yaklaşık 500 milyon dolar düzeyinde olduğu düşünülmektedir. Teknoparklarda faaliyet gösteren biyoteknoloji firmalarının sayısı 2010 yılı itibariyle 120 civarında olup bu firmaların %5'ini gıda alanında faaliyet gösteren firmalar oluşturmaktadır (Kiper 2013).

Endüstriyel alanda en fazla ihtiyaç duyulan biyoteknolojik ürünler arasında gıda sektöründe sıklıkla kullanılan enzimler gelmektedir. Bu enzimler bitkilerden, hayvanlardan ya da mikroorganizmalardan elde edilmektedir ve mikrobiyal enzimler diğer enzim kaynaklarına göre ekonomik olması ve yüksek verimliliği nedeni ile daha fazla tercih edilmektedir. Ayrıca mikrobiyal enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, daha stabil ve yüksek miktarlarda elde edilebilmeleride mikrobiyal enzimleri birincil enzim üreticisi haline getirmektedir. Gıda proseslerinde enzimler,

biyodönüşüm ve sentez, ekstraksiyonların geliştirilmesi, viskozitenin azaltılması ve tattaki değişimler gibi pek çok işlem için kullanılmaktadır (Kıran ve diğ. 2006). Mikrobiyal enzim üretiminin gerçekleştirilebilmesi için mikroorganizma seçimi GRAS (Generally Recognized as Safe, genel olarak güvenilir kabul edilen), mikroorganizmanın üretilmesi istenilen enzimi üretme yeteneği, enzimin hücredeki lokalizasyonu ve ilgili parçalama metotlarının endüstriyel ölçekte optimizasyonu, enzim için gerekli olan uygun pH, sıcaklık, spesifik substratlar ve inhibitörlerin bilinmesi önemlidir(Panesar ve diğ. 2010). Bu parametreler dikkate alınarak enzim üretimi için gerekli ortam koşulları oluşturulmalı ve enzim üretimi maksimum miktara ulaştırılmalıdır. Bu nedenle fermantasyon ortamının içeriğindeki bileşenler çok iyi seçilmiş olmalıdır. Mikrobiyal enzimler hücre içi ya da hücre dışı olarak eksprese edilebilmektedir. Bu enzimler kullanım alanlarına göre farklı saflaştırma işlemlerine ihtiyaç duymaktadır.

Bu çalışmada *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşundan elde edilen hücre içi Dipeptidil peptidaz IV (DPP IV) enziminin gıda morfinlerinin yol açtığı bazı hastalıklarla mücadelede gıda takviyesi olarak kullanılabilceği düşünülmüş ilgili suşların biyokütlesi arttırılmış ve bu suştan optimizasyonu yapılan hücre parçalama metotları ile geri kazanılan hücre içi enzime kısmi bir saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu için optimum sıcaklık ve pH, spesifik substrat ve inhibitör maddelerin enzime olan etkileri araştırılmıştır.

2. ENZİMLER

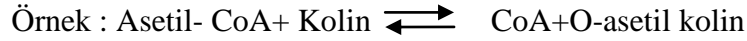
2.1 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler Uluslararası Enzim Komisyonu'nca, katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göre sınıflandırılmış, ve 6 ana gruba ayrılmışlardır. Bunlar;

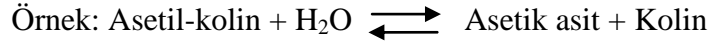
1. **Oksidoredüktazlar:** İki substrat arasındaki oksidasyon - redüksiyon tepkimelerini katalizler.



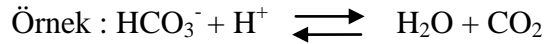
2. **Transferazlar:** İki sustrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini katalizler.



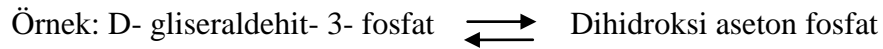
3. **Hidrolazlar:** 1 mol H₂O molekülünün katılmasıyla kimyasal bağın kırılmasını katalizler.



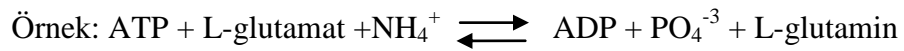
4. **Liyazlar:** Substrattan grupların uzaklaştırılmasını hidrolizden farklı bir mekanizma ile gerçekleştirerek, çift bağların oluşumunu katalizler.



5. **İzomerazlar:** Geometrik, optik ve pozisyon izomerlerinin birbirine dönüşümlerini katalizler.



6. **Ligazlar:** Yüksek enerjili bileşenlerdeki fosfat bağlarının kopması sonucunda ortaya çıkan enerji yardımıyla iki bileşiğin bağlanmasını katalizler.

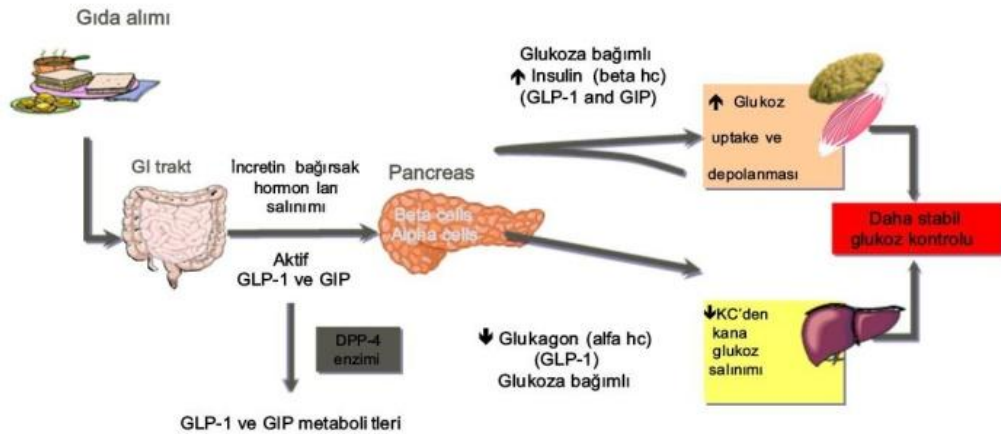


Bu sistemde her enzime sistematik bir isim ve sınıflandırma numarası verilmiştir. Kullanılan kod numarası E.C. (Enzyme Code) harflerinden sonra gelen ve sınıflandırılan enzimlerin sınıflandırmadaki yerini belirten 4 rakamdan oluşur (Gökalp ve diğ. 2002).

2.2 Dipeptidil peptidaz IV (DPP IV) enzimi

Dipeptidil peptidaz IV enzimi fare karaciğerinde çeşitli enzim aktivitelerini inceleyen Hopsu ve Havu (1966) tarafından keşfedilmiştir. DPP IV pekçok memeli, bitki, böcek ve mikrobiyal hücrelerden izole edilmiştir. DPP IV enziminin hücredeki yeri, kaynağına göre hücre içi, membrana bağlı ve hücre dışı olarak bulunabilmektedir. DPP IV enzimi insan vücudunda endokrin sistem, bağışıklık sistemi, gastrointestinal sistem ve sinir sisteminin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bununla birlikte bu enzim pankreas kanserinin ve böbrek hasarının tespiti ve tümör yükünün belirlenmesi için kullanılır (Üstün-Aytekın ve diğ. 2016).

Besin alımı sonucu bağırsaktan salgılanan hormonlar inkretin hormonları olarak tanımlanmaktadır. İnkretin hormonlar glukagon benzeri peptit- 1 (Glucagon like peptide 1, GLP-1) ve glukoz bağımlı insülinotropik peptit (GIP) olarak adlandırılır. GLP-1, ileum ve kolonda yer alan ve GIP ise bağırsağın daha üst bölgelerinde yer alan hücrelerden salgılanır. İnkretin hormonlar pankreas β hücrelerinden glukoz ile uyarılan insülin salgılanmasını artırır. Etkileri, kendilerine özel reseptörleri sayesinde oluşur. GLP-1 hormonunun insülin salgılanması üzerindeki etkisi dışında, insülin biyosentezinin uyarılması, glukagon salgılanmasının inhibe edilmesi, gastrik boşalmanın geciktirilmesi, yiyecek alımının azaltılması gibi etkileri de vardır. GLP-1 ve GIP, dipeptidil peptidaz IV (DPP IV) enzimi tarafından hızla inaktif metabolitlerine dönüştürülür (Sentandreu ve Toldra 2001, Brandt ve diğ. 2006). Şekil 2.1'de DPP IV enziminin inkretin hormonlar üzerine etkisi görülmektedir.

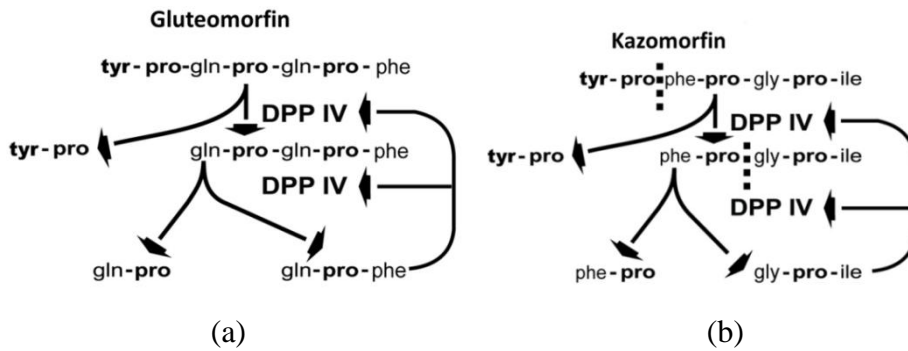


Şekil 2.1: DPP IV enziminin inkretin hormonlar üzerine etkisi (Yılmaz 2014)

İnsan periferel kan lenfositlerinin yüzeyinde DPP IV'ün tespit edilmesi bu enzimin bağışıklık sisteminde bir rolü olduğunu kanıtlanmıştır. Buna ek olarak CD26 ve lökosit aksitivasyon işaretleyicisi olarak tasarlanan T-lenfosit yüzey antijeninin DPP IV olduğu sonucuna varılmıştır. DPP IV enziminin yaygın olarak sağlıklı, iyi huylu ve kötü huylu hücrelerde eksprese edildiği bildirilmiştir. Bu özelliği sayesinde tümör belirlemede kullanılan bir işaretleyici olarak tanımlanmıştır. Örneğin, skuamöz hücreli akciğer kanserinde anlamlı derecede yüksek seviyede DPP IV bulunmuştur (Kikkawa ve diğ. 2005).

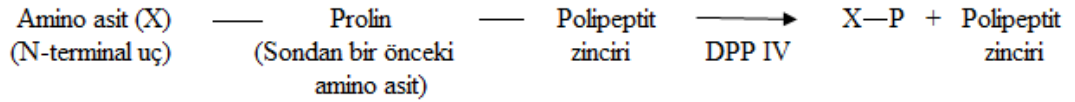
DPP IV enzimi sindirim sisteminde peptitleri küçük peptit dizilerine parçalamakla görevlidir. Enzimin eksikliği sebebiyle gluten ve süt proteinlerinin sindirimi sırasında proteinler yeteri kadar parçalanamadığı için gastrointestinal sorunlar ortaya çıkmaktadır. İnce bağırsak enterositindeki DPP IV eksikliği ya da yokluğu, peptitlerin parçalanmasını önleyerek alerjik reaksiyonların oluşmasına neden olabilir (Duke-Cohan 1995).

DPP IV enzimi merkezi sinir sistemine olumsuz etkisi olan opioid peptitler ile ilişkilendirilmiştir. Opioid peptitler, gıdaların işlenmesi sırasında açığa çıkan morfin yapıları olarak bilinmektedir. Süt, tahıl ve sebze gibi gıdaların proteinleri opioid peptit yapısını içermektedir ve otistik bireylerde bu yapı parçalanmadan kan beyin bariyerinden geçmektedir. Bu durum otistik bireylerin kendilerine zarar vermelerine, çevreleriyle iletişim kurmalarında zorluk yaşamalarına sebep olmaktadır. Opioid peptitlerin peptit dizilerinde bulunan prolin aminoasidi DPP IV enzimi ile parçalanabilmektedir (Şekil 2.2) (Marchetti ve diğ. 1990, Kınık ve Görsoy 2002, Brudnak 2005).



Şekil 2.2: Opioid peptit olan kazomorfin (a) ve gluteomorfin (b) yapılarının hidrolizi

DPP IV enziminin katalizlediği reaksiyonlarda polipeptitler dipeptitlere parçalanmaktadır (Senten ve diğ. 2002). X-prolil-dipeptidil olarak bilinen bu enzim peptitin N-terminal ucundan başlayarak X-Pro bağımlı hidroliz edebilen, proline spesifik bir enzimdir (Sanz ve Toldra, 2001). DPP IV enzimi için kullanılan kod E.C.3.4.14.5.'tir. Bu sınıflandırmaya göre DPP IV; hidrolazların alt grubu olan peptidazlar alt grubunda ekzo-peptidazlar alt alt grubundaki serin peptidazın bir alt ailesi olan proliloligopeptidaz (POP) ailesine mensuptur. Serin peptidazların aktif bölgelerinde serin aminoasidi bulunur ve serin peptidazlar substratların N-terminal ucundaki prolini hidrolizler. Endopeptidazlar polipeptit zincirinin içinden hidroliz gerçekleştirirken ekzo-peptidazlar polipeptit zincirinin bir ucundan başlayarak hidroliz gerçekleştirirler. Serin peptidazların bir alt ailesi olan proliloligopeptidazlar, polipeptit zincirinde sondan bir önceki pozisyonda bulunan prolin aminoasidine spesifiktir ve bu noktadaki peptit bağımlı hidrolizler. Şekil 2.3'te DPP IV enziminin polipeptit zincirindeki peptit bağımlı hidrolizlemesi gösterilmiştir.

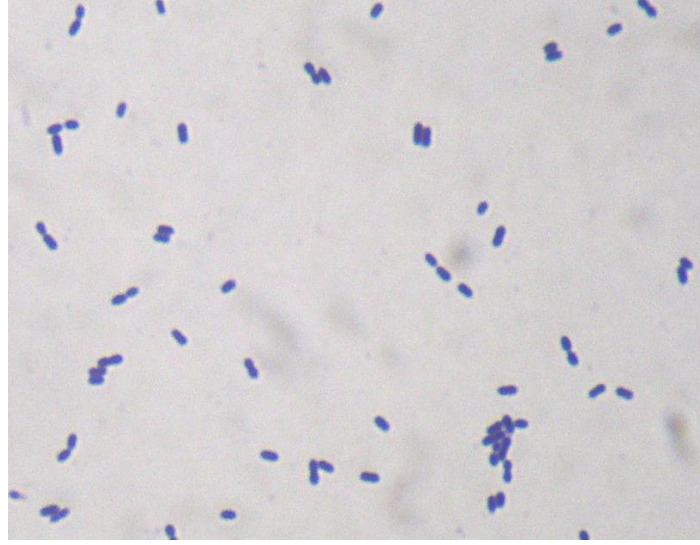


Şekil 2.3:DPP IV enziminin katalitik etkisi

2.3 *Lactococcus lactis* spp. *lactis* bakterisi

Fermente gıda endüstrisinde önemli bir yere sahip olan laktik asit bakterileri (LAB) içinde yer alan laktokoklar (*Lactococcus* sp.); Gram-pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, hareketsiz, fakültatif anaerob bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Tunail, 2009). *Lactococcus* cinsine ait bakteriler pH 9.2 ve %4 tuz konsantrasyonunda ve 10°C'de gelişir, ancak 45°C'de gelişemezler (Madigan ve diğ. 1997). Optimum gelişme sıcaklığı yaklaşık 30°C'dir (Hutkins, 2006). Laktokoklar süt ve süt ürünlerinin üretimi sırasında tat ve aromanın oluşturulmasında önemli rol oynar. Laktokokların bu etkisi mikroorganizmanın sahip olduğu enzim sisteminden kaynaklanmaktadır. Laktokoklarda hidroliz 3 aşamadan oluşmaktadır. 1. aşama hücre dışına salgılanan proteinazlar ile proteinin hücre dışında değişik uzunluklarda peptitlere hidrolizlenmesi; 2. aşama oluşan peptitlerin oligopeptit transport sistemi ile hücre içine alınması ve 3. aşama hücre içine alınan peptitlerin

hücre içi peptidazlar tarafından amino asitlere parçalanmasıdır (Akçelik ve Şanlıbaba 2000). DPP IV enzimi *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşu tarafından üretilen hücre içi bir hidrolaz enzimdir. Bu nedenle enzimin elde edilebilmesi için hücrenin parçalanması gerekmektedir. Kullanılan suş Gram-pozitif hücre duvarına sahiptir. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin hücre duvarında temel olarak peptidoglukan yapı ortaktır ancak bu yapı Gram-pozitiflerde Gram-negatiflere göre daha kalındır. Bu durum Gram-pozitif hücre duvarının Gram-negatif hücre duvarından daha zor parçalandığını göstermektedir (Tunail 2009).



Şekil 2.4: *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşuna ait Gram boyama görüntüsü

2.4 Enzim saflaştırması ve karakterizasyonu

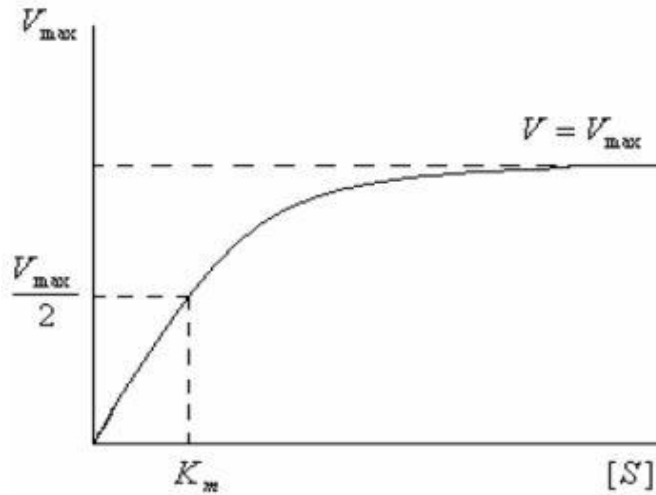
Enzimlerin kullanım alanları her geçen gün artmaktadır. Bu durum verimli üretim teknikleri ve üretim maliyeti üzerine çalışılmasını gerekli kılmaktadır. Enzimler, biyolojik kaynaklardan elde edilmektedir ve elde edilen enzimin kullanılabilmesi için kullanım alanına göre yeterli saflıkta olması gerekmektedir. Enzimler kaynağından ilk elde edildiğinde ortamda istenilen enzim dışında kaynaktan elde edilen farklı enzimler de bulunur ve üretimi istenen enzimin özelliklerinin belirlenebilmesi için diğer enzimlerden ayrılması gerekir. Enzim saflaştırılması yapılırken saflaştırılan enzimin kullanım alanı, enzimin fizikokimyasal özellikleri, enzimin kaynaktan bulunduğu yer gibi faktörlere dikkat edilmelidir. Enzim saflaştırılırken hücrede bulunduğu yer önemlidir. Hücre içi bir enzimse hücre

parçalama gibi ek işlemlere gerek duyulurken hücre dışı bir enzimse bu işleme gerek duyulmaz. Saflaştırma yapılırken kullanılacak metotların seçiminde enzimin çözünürlüğü, molekül büyüklüğü, elektriksel yükü gibi özellikleri dikkate alınmalıdır.

Enzimin karakterizasyonunun yapılabilmesi için öncelikle enzimin saflaştırılması gerekir. Saflandırmadan sonra enzimin optimum pH'ı, çalıştığı optimum sıcaklık, enzime spesifik substrat ve enzim üzerinde etkili olabilecek inhibitör maddelerin araştırılması gibi enzime ait özelliklerin belirlenmesi gereklidir.

2.5 Enzim kinetiği

Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir enzim-substrat kompleksi oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür. Enzim reaksiyonları ile ilgili ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis- Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağıllığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir eğri elde edilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Michaelis-Menten grafiği

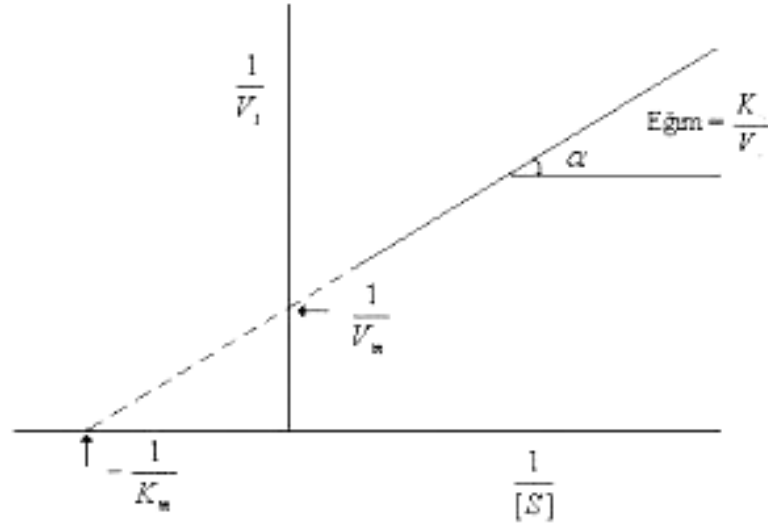
$$V = \frac{V_{max} \times [S]}{[S] + K_m} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

Eşitlik 1’de V_{max} , hiperbolün Y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirlenir. Maksimum hızın yarısına ($V_{max}/2$) karşılık gelen substrat derişimi K_m (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir. V_{max} ve K_m , bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli sabitlerdir.

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacıyla bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla uygun şekilde değiştirilerek, doğru denklemi elde edilebilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Eşitlik 2’ye göre Y ekseninde $1/V$, X ekseninde $1/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise K_m/V_{max} ’ dır (şekil 2.6).



şekil 2.6: Lineweaver-Burk grafiği

2.6 Enzim inhibisyonları

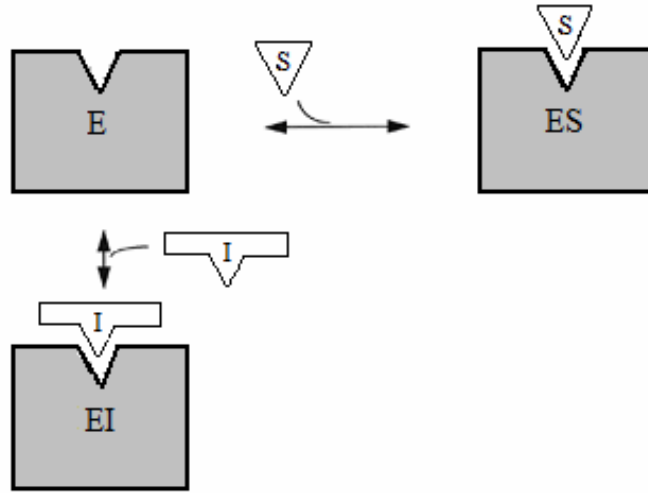
Doğal veya sentetik bileşikler enzimlerin katalitik aktivitelerini yavaşlatır yada yok eder. Enzim aktivitesinin yavaşlatılması veya yok edilmesi durumuna

inhibisyon, bu etkiye sebep olan maddelere de inhibitör denir. İnhibisyonlar dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak 2 gruba ayrılırlar.

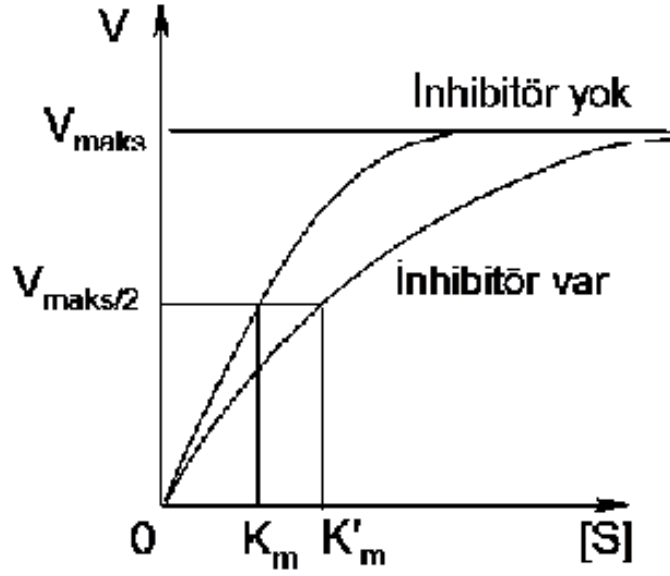
Dönüşümsüz İnhibisyonlar: Bu inhibisyonda, spesifik bir grup ile enzim arasında kovalent bir bağ oluşur. İnhibitörler aktif bölgeye bağlanabildikleri gibi başka bir bölgeye de bağlanarak enzim aktivitesini bloke edebilirler. Substrat konsantrasyonunu arttırmak etkilerini ortadan kaldırmaz.

Dönüşümlü inhibisyonlar: Dönüşümlü inhibitörler enzim ile geçici bir süre birlikte bulunurlar. Enzim ile inhibitör arasında bir inhibisyon dengesi kurulur. Dönüşümlü inhibisyonlar 3 farklı gruba ayrılır.

Yarışmalı (Competitive) inhibisyon: Bu inhibisyonda inhibitör (I) enzimin aktif bölgesine bağlanır, enzim inhibitör kompleksi (EI) oluşturur ve enzim substrat kompleksinin (ES) oluşmasını engeller (Şekil 2.7). Ortamdaki substrat konsantrasyonu artırılarak inhibisyon etkisi azaltılabilir ya da ortadan kaldırılabilir. Yarışmalı inhibisyonda V_{max} değeri değişmezken, K_m değeri artar (Şekil 2.8).

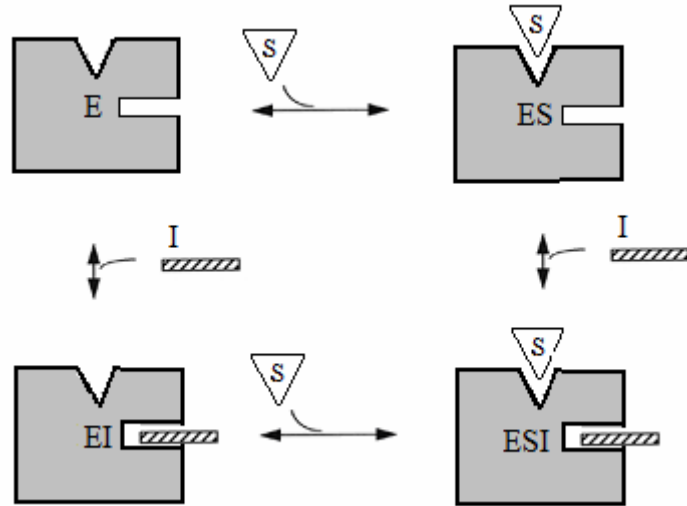


Şekil 2.7: Yarışmalı inhibisyon mekanizması

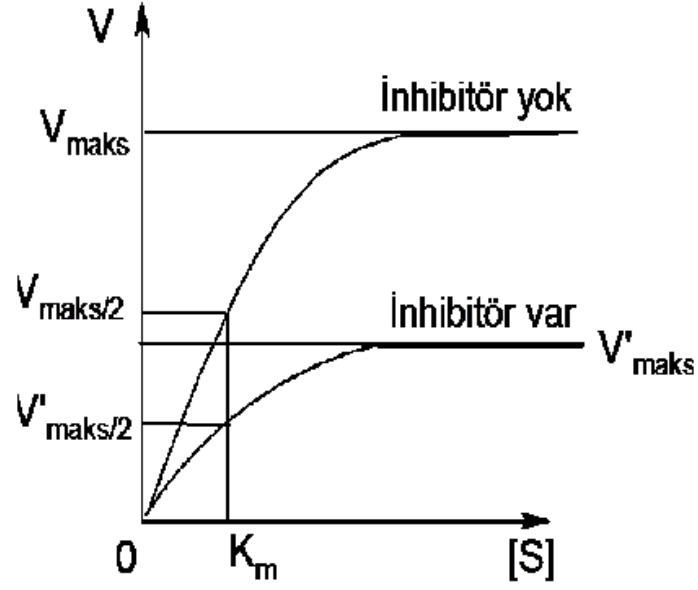


Şekil 2.8: Yarışmalı inhibisyona ait Michaelis-Menten grafiği

Yarışmasız (Noncompetitive) inhibisyon: Bu inhibisyon tipinde inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmak yerine enzime veya enzim substrat kompleksine dönüşümlü olarak bağlanır (Şekil 2.9). Ortamdaki substrat konsantrasyonunu arttırmak inhibisyon etkisini azaltmaz. Yarışmasız inhibisyonda V_{max} değeri azalır ancak K_m değeri değişmez (Şekil 2.10).

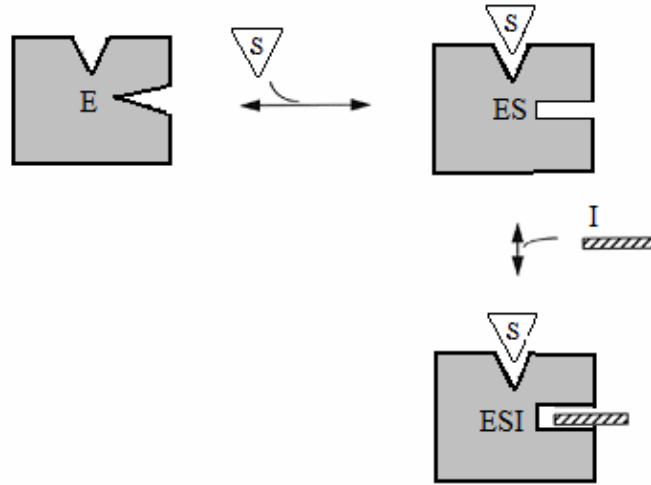


Şekil 2.9: Yarışmasız inhibisyon mekanizması

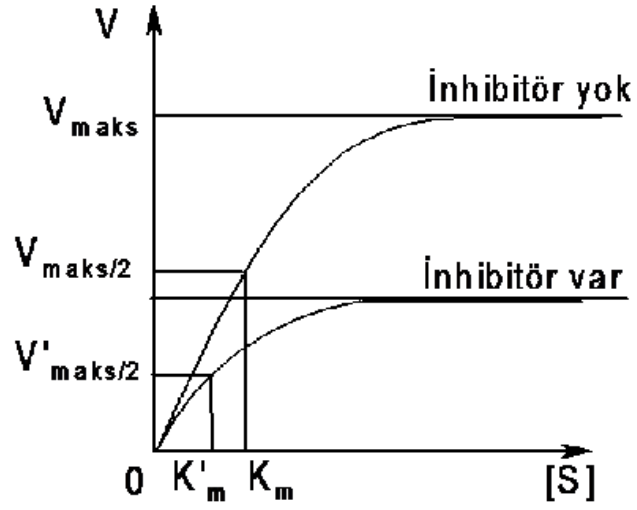


Şekil 2.10: Yarışmasız inhibisyona ait Michaelis-Menten grafiği

Yarışmayan (Uncompetitive) inhibisyon: İnhibitör enzim substrat kompleksine bağlanarak etki gösterir. Serbest enzim üzerinde etkisi yoktur (Şekil 2.11). Yarışmayan inhibisyonda hem V_{\max} hem de K_m değerleri azalır (Şekil 2.12) (Gökalp ve diğ. 2002, Bayraktar 2009).



Şekil 2.11: Yarışmayan inhibisyon mekanizması



Şekil 2.12: Yarışmayan inhibisyona ait Michaelis-Menten grafiği

Enzim kinetiği sayesinde reaksiyonların katalitik mekanizması, enzim spesifikliği ve enzimin kimyasal özellikleri hakkında bilgi sahibi olunabilir. Yaptığımız çalışmada DPP IV enziminin kinetik özelliklerini belirlemek için substrat spesifikliği, pH ve sıcaklığın enzim üzerine etkisi ile inhibitör maddelerin mekanizmaları çalışılmıştır.

3. MATERYAL- METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Saf kültür

Çalışmamızda kullanılan *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşu (NRRL-1821), Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı, Araştırma, Eğitim ve Tarımsal Araştırma Şubesi, ARS Kültür Koleksiyonu'ndan (NRRL) temin edilmiştir.

3.1.2 Besi ortamları

M17 Broth (Merck, Almanya): 42,5g besiyeri tartılarak 1L distile suda çözülmüş 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

M17 Agar (Merck, Almanya): 55g besiyeri tartılarak 1L distile suda çözülmüş 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında aseptik şartlarda steril petrilere dökülmüştür.

3.2 Metot

3.2.1 Saf kültürün üretime hazırlanması

Saf kültür “Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü” laboratuvarında bulunan steril kabin (Nüve LN120, Türkiye) içinde açılmıştır. Kabin %10'luk zefiran çözeltisi ile temizlenmiş ve ardından 15 dakika süresince ultraviyole ışığa maruz bırakılmıştır. Bek alevi yanında saf kültür, steril sıvı besiyerine (M-17 Broth) aktarılmış ve çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen kültür 10 ml steril sıvı besiyerine aktarılmıştır. Elde edilen ortamdan 10'ar mL sıvı besiyeri içeren tüplere

%10 (hacim/hacim, v/v) oranı ile transfer edilmiştir. İnokülasyon yapılan tüpler 30°C sıcaklıkta 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2 Saf kültürün dondurulması ve muhafazası

İnkübasyon sonrasında steril kabinde önceden 121°C'de 15 dakika süresince otoklavlanmış eppendorf tüplere 500 µL inokülant ve 500 µL %60'luk gliserol ilave edilmiş, inokülantın hacmen %50 oranında gliserol ile karışması sağlanmıştır. Hazırlanan eppendorf tüpler hemen -80°C sıcaklığındaki dolaplara alınmış ve stok kültürler hazırlanmıştır.

3.2.3 Mikroorganizmaların inokülasyon oranlarının belirlenmesi

Mikrobiyal suşların üretiminde optimum inokülasyon oranının belirlenmesi büyüme kinetiği eğrisindeki gecikme fazını etkilediği için önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle ilgili suşun üretimine başlanmadan önce optimum inokülasyon oranı belirlenmelidir. Çalışmada kullanacağımız inokülasyon oranının belirlenmesi için literatür araştırması yapılmıştır ve çalışmalarda laktik asit bakterileri için kullanılan inokülasyon oranlarının %1, %5 ve %10 şeklinde rapor edildiği görülmüştür (Guzman ve diğ. 2006, Üstün ve Öngen 2012, Kabanova ve diğ. 2009). Bu nedenle çalışmada *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun inokülasyon oranları için %1, %2, %5 ve %10'luk inokülasyon oranları denenmiştir. Bu amaçla -80°C'de depolanmış *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşu (NRRL-1821) M-17 broth besiyerinde aktifleştirilmiş ve içerisinde 100 ml steril M-17 broth bulunan 250 mL'lik erlenmayerlere belirlenen (v/v) oranlarda inoküle edilmiştir. *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun üretimi 30°C sıcaklığa ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 150 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Üretim boyunca 1 saat aralıklarla örnek alınarak 660 nm'de zamana karşı optik yoğunluk (Optical Density, OD) ölçümü yapılmıştır.

3.2.4 Mikroorganizmaların üretimi

Optimum inokülasyon oranı belirlenen ve aktifleştirilen *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşu (NRRL-1821) içerisinde 50 mL steril M-17 broth bulunan 250mL'lik erlenmayerlere %5 (v/v) oranında inoküle edilmiştir. *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun üretimi 30°C sıcaklığa ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 150 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 OD₆₆₀-koloni oluşturan birim/mL (kob/mL) korelasyonu

Lactococcus lactis spp. *lactis* suşunun (NRRL-1821) inokülasyon oranının belirlenmesi ve uygun oranda inoküle edilerek aktifleşmesi sonucunda zamana karşı elde edilen optik yoğunluk (zaman-OD) grafiği büyüme kinetiği hakkında fikir vermekte ancak hücre sayısı ile ilgili bir bilgi vermemektedir. Bu nedenle elde edilen OD₆₆₀değerlerine karşı koloni oluşturan birim/ mL korelasyonu belirlenmiştir.

İnokülasyonu yapılan *Lactococcus lactis* spp. *lactis* (NRRL-1821) suşundan 5 ml alınarak içerisinde 5 mL steril M-17 broth bulunan tüpe aktarılmış ve 2 kat seyreltmesi sağlanmıştır. Bu seyreltme işlemi 6 kez tekrarlanmıştır. Örneklerden 1'er mL alınarak içerisinde 9 mL steril fizyolojik su (SFS) bulunan tüplere aktarılmış ve 1. dilüsyon hazırlanmıştır. Bu işlem 8 kez tekrarlanarak örneklerden 8 farklı dilüsyon hazırlanmıştır. Seyreltilen örneklerin 660nm'de OD değerleri de okunmuştur. Hazırlanan dilüsyonlardan 1'er mL alınarak M-17 agar besiyerine dökme ekim metoduyla petrilere ekim yapılmıştır (Harrigan, 1998). Petriler 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılmış ve OD₆₆₀-koloni oluşturan birim/mL (kob/mL) korelasyonu lineer regresyon analizi ile hesaplanmıştır.

3.2.6 Hücre hasatı

DPP IV enzimi *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşu (NRRL-1821) tarafından hücre içi bir enzim olarak eksprese edilmektedir. Bu nedenle hücrenin parçalanması ve enzimin suda çözünebilir formda açığa çıkarılması gerekmektedir. Hücreler büyüme kinetiğinde durağan faza ulaştığında 8000 rcf santrifüj hızında 15 dakika

santrifüj edilmiş, üretim ortamı ve hücre pelleti birbirinden ayrılmıştır. Ayrılan pellet 5 mL 0,1 M Tris-HCl (pH:8,0) tamponu ile yıkanmış ve yeniden 8000 rcf'te 5 dakika santrifüjlenmiştir. Aynı Tris-HCl (pH:8,0) tamponunu kullanarak yıkama işlemi 2 kez tekrarlanmış üretim ortamının pelletten tamamen ayrılması sağlanmıştır.

Hücre hasatından sonraki adım hücre içi DPP IV enziminin bir hücre parçalama metodu kullanılarak geri kazanımıdır. Bu işlemler süresince ne kadar enzim geri kazandığımızı tespit edebilmek için spesifik substrat Gly-Pro-p-nitroanilide hydrochloride (Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır.

3.2.7 DPP IV enzim aktivitesinin ölçülmesi ve standart eğri çizimi

Enzim aktivitesinin ölçülmesinde ve standart eğri çiziminde kullanılan çözeltiler sırası ile şöyledir;

1M HCl: 8,3mL HCl saf su ile 100mL'ye tamamlanarak 1M'lık HCl çözeltisi hazırlanmıştır.

0,1M Tris-HCl (pH:8,0): 500 mL saf suda 6,055g Tris çözülerek 0,1 M'lık Tris çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin pH'sı 1M'lık HCl ile pH8,0'e ayarlanmıştır.

1mM p-Nitroaniline: p-Nitroaniline(Sigma N-2128) 0,0138 g tartılarak 1 mL metanolde çözülmüş ve distile su ile 100ml'ye 0,1M Tris-HCl ile tamamlanmıştır.

1 mM Gly-Pro-p nitroanilide: 25mg Gly-Pro- p-nitroanilide hydrochloride (Sigma G-0513),760 µL Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0) tamponu içinde çözülmüş ve 10 µL'lik eppendorflara porsiyonlanarak -20°C sıcaklığındaki derin dondurucularda saklanmıştır. Her analizden önce tampon çözeltisi ile seyreltilerek 1 mM konsantrasyonunda substrat elde edilmekte ve bundan 100 µL kullanılmaktadır.

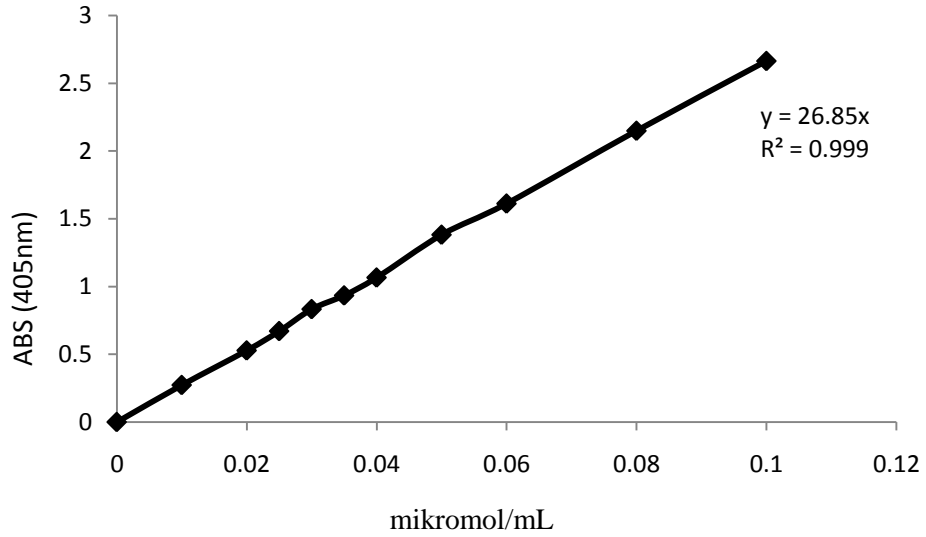
DPP IV enziminin spesifik substrat ile optimum koşullarda inkübasyonu ile katalize olan reaksiyon sonunda elde edilmesi beklenen ürün p-nitroaniline'dir. Enzim aktivitesi tanımında belirtildiği gibi 1 µmol substratın 1 dakika içinde 1 µmol ürüne dönüşmesini sağlayan enzim birimi 1 Ünite'dir. Bu nedenle Tris-HCl tamponu ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış p-nitroaniline'in (Tablo 3.1) 405 nm

absorbans (ABS) ile verdiği değerler p-nitroaniline konsantrasyonları ile ilişkilendirilmiş ve elde edilen standart eğriden enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

Tablo 3.1 Tris tamponu kullanarak hazırlanan p- nitroaniline konsantrasyonları

1mM p- Nitroaniline (mL)	Tris-HCl çözeltisi (mL)
0,050	0,950
0,100	0,900
0,125	0,875
0,150	0,850
0,175	0,825
0,200	0,800
0,250	0,750
0,300	0,700
0,400	0,600
0,500	0,500

Tablo 3.1’de belirtilen oranlara göre hazırlanan çözeltiler 96-kuyulu mikroküvetlere aktarılmıştır. Mikro küvet okuyuculu spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ile 15 dakika süresince 37°C sıcaklıkta inkübe edilen küvetlerin absorbans değerleri 15 saniyelik çalkalamanın ardından 405nm’de okunmuştur ve Şekil 3.1’de görülen p- nitroaniline standart eğrisi çizilmiştir.



Şekil 3.1: p- nitroaniline standart eğrisi

3.2.8 Protein miktarı ölçümü

Lactococcus lactis spp. *lactis* suşundan elde edilecek DPP IV enzimini saflaştırma adımları boyunca takip etmek için enzim miktarının belirlenmesi yeterli olmaz. Enzimi verimi veya kaybı için hassas bir protein içeriği belirleme metodunun kullanılması gerekir. Bu nedenle protein miktarı ölçümü için Bicinchoninicacid kiti (BCA, Thermo No=23225, ABD) kullanılmıştır. BCA metodu 25-2000 µg/ml konsantrasyona sahip protein miktarlarına oldukça iyi cevap vermektedir.

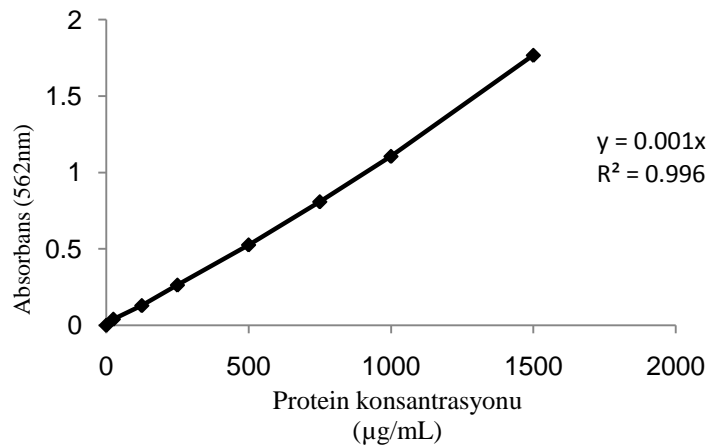
Protein içeriği ölçümü için standart eğri çizimi

Bu metotta bovine serum albümin (BSA) proteini standart protein olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle kit içindeki 2mg/mL konsantrasyonuna sahip BSA stok çözeltisi kullanılarak 25-2000µg/mL aralığında standart konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Standart eğri çizimi için hazırlanan konsantrasyonlar Tablo 3.2’de belirtilmiştir.

Tablo 3.2 BCA protein içeriği analizi için hazırlanan BSA konsantrasyonları

Dilüsyon		Tris- HCl çözeltisi
A	300 µL stok BSA	0 µL
B	375 µL stok BSA	125 µL
C	325 µL stok BSA	325 µL
D	175 µL dilüsyon B	175 µL
E	325 µL dilüsyon C	325 µL
F	325 µL dilüsyon E	325 µL
G	325 µL dilüsyon F	325 µL
H	100 µL dilüsyon G	400 µL
I	0 µL	400 µL

Hazırlanan dilüsyonların üzerine 200 µL boya çözeltisi ilave edilmiş ve 37°C sıcaklıkta 30 dakika sürecince inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiş, 96 kuyulu mikroküvete aktarılmış ve 562 nm’de absorbanları ölçülmüştür. Hazırlanan standart eğri Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2: Protein konsantrasyonu için kullanılan lineer regresyon eğrisi

Her analiz için hazırlanan ve Şekil 3.2’de verilen standart eğri denklemi kullanılarak protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.2.9 DPP IV enzimin saflaştırılması

3.2.9.1 Sonikatör ile hücre parçalanması ve optimizasyonu

DPP IV enziminin hücre içi eksprese olan bir enzim olması nedeni ile hücre parçalama işleminin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle fiziksel bir parçalama metodu olan sonikatör (Bandelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) ile parçalama uygulanmıştır. Hasat edildikten sonra yıkanan hücreler 0,1 M Tris-HCl tamponu içerisine süspansiyon edilmiş ve sonikasyon işleminde kullanılacak olan değişkenleri içeren bir deney planı çıkarılmıştır.

Optimizasyon için kullanılacak olan plan Design Expert (Version 9.0.3) programında hazırlanmıştır. Oluşturulan deney tasarımında yüzey cevap metodu (Response Surface Methodology, RSM) ve Box Behnken Dizayn (BBD) modeli kullanılmıştır.

Cevap yüzey metodu sayesinde basit modeller kullanarak sistem modellenilebilmekte, sistemin yanıtını etkileyen çok sayıda değişken bir arada ve eşzamanlı olarak incelenebilmekte ve prosesin işlem parametrelerindeki değişime verdiği yanıt en az sayıda deneme yapılarak en iyi şekilde tanımlanabilmektedir. Çok farklı gıda proseslerinde başarıyla uygulanabilmesi ve çok fazla yanıt dikkate alınarak optimum noktanın belirlenmesine olanak sağlaması, gıda işlemede yanıt yüzey yönteminin diğer optimizasyon yöntemleri arasından öne çıkmasının en önemli nedenleri arasındadır (Koç ve Ertekin 2009). Sonikasyon işleminin optimizasyonunda BBD modeli kullanılmasının temel nedeni mevcut faktörler (süre, güç ve döngü) için küçük, uygulaması kolay bir deney deseni vermesi ve diğer modellere göre faktör sayısına uygun daha güvenilir sonuçlar verebilmesinden kaynaklanmaktadır.

Deney planı oluşturulurken enzim aktivitesi üzerinde etkili olan faktörler seçilmiştir. Kullanılan cihaz için (bu faktörler; güç, süre ve cycle (döngü) dir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 Çalışma sıklığı seviyeleri (Pulsed cycle değeri)

Çalışma sıklığı seviyesi (pulsed cycle)	Aktif çalıştığı süre (s)	Çalışmadığı süre (s)
1	0,1	0,9
2	0,2	0,8
3	0,3	0,7
4	0,4	0,6
5	0,5	0,5
6	0,6	0,4
7	0,7	0,3
8	0,8	0,2
9	0,9	0,1
-	1	0

Tablo 3.3’de görülen çalışma sıklığı akustik kavitasyon ile yapılan bu parçalamanın 1 saniye içerisinde aktif çalıştığı süre ile çalışmadığı süreyi gösteren bir parametredir. Sonikasyon işleminin optimizasyonunda kullanılan faktörler, bu üç faktörlerin seviyeleri ve operasyon koşulları ile etkileşimleri geri kazanılan DPP IV aktivitesini etkileyecektir. Seçilen değişkenler Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.4 Sonikasyon işleminin optimizasyonunda kullanılan deneysel dizayn değişkenleri (süre, güç, döngü) seviyeleri

Deney sayısı	Süre (dakika)	Güç (%)	Döngü
1	15,25	55,00	4,00
2	0,50	10,00	4,00
3	30,00	55,00	1,00

Tablo 3.4 (devamı)

4	15,25	100,00	1,00
5	0,50	55,00	7,00
6	30,00	100,00	4,00
7	30,00	55,00	7,00
8	0,50	100,00	4,00
9	3,00	10,00	4,00
10	15,25	100,00	7,00
11	15,25	10,00	7,00
12	0,50	55,00	1,00
13	15,25	10,00	1,00
14	15,25	55,00	4,00
15	15,25	55,00	4,00

Tablo 3.4’de verilen faktörlerden görüldüğü gibi 3 tane seçilmiş sınır değeri(minimum, maksimum ve ortalama) göz önüne alınarak analiz yapılmıştır. Bu seviyeler -1, 0 ve 1 ile kodlanmıştır. Bu nedenle BBD 3 merkez noktayı içeren 15 deney sayısı ile tamamlanmıştır. Bu modelin istatistiksel analizi varyans (ANOVA) analiziyle yapılmıştır. İlgili eşitlik ve modeller bulgular ve tartışma bölümünde verilmiştir. Sonikasyon işlemi sırasında sıcaklık artışının DPP IV aktivitesini etkilememesi için parçalama buz banyosu içerisinde yapılmıştır. Tablo 3.4’de verilen sonikasyon işlemleri sonrasında lizat süspansiyonu 8000 rcf’te 15 dakika süresince santrifüjlenmiş, süpernatant ve pellet birbirinden ayrılmıştır. Elde edilen örneklerle enzim aktivitesi tayini yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre optimum parametre değerleri belirlenmiştir.

3.2.9.2 Santrifügal filtrasyon (Ultrafiltrasyon)

Parçalama işlemi sonrasında elde edilen süpernatant fraksiyonu suda çözünen DPP IV enzimini içermektedir. Yapılan bu santrifügal filtrasyon işlemi ile DPP IV enziminin bulunduğu tampon içerisindeki konsantrasyonunun artırılması amaçlanır. Bu işlemde santrifügal filtreler kullanılmaktadır. Santrifüj işlemi sırasında oluşan merkezkaç kuvveti moleküllerin ağırlıklarına göre filtre yüzeyindeki porlardan geçmesini sağlar. Büyük moleküller porlardan geçemez ve filtrenin üzerinde kalarak retentat olarak adlandırılan kısmı oluşturur, küçük moleküller ise filtreden geçerek permeat olarak adlandırılan kısmı oluşturur. Çalışmamızda iki farklı molekül ağırlığına göre seçilmiş santrifügal filtrasyon tüpü kullanılmıştır ve kullanım sırasına göre bunlar; 50 kDa ve 100 kDa'dur. Bu işlem 6000 rcf'te 10 dakika süreyle yapılmaktadır. Yapılan santrifüj işlemlerinden sonra permeat ve retentat olarak ayrılan kısımlara enzim aktivitesi tayini yapılmıştır.

3.2.9.3 Amonyum sülfat çöktürmesi

Saflaştırma adımlarının bu basamaktan sonrası Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Biyoproses ve Bitki Genetiği Laboratuvarlarında (İstanbul) gerçekleştirilmiştir. Santrifügal filtrasyon ile enzimin konsantrasyonu artırılmıştır ve enzimin konsantre edilmesine devam edilecektir. Bu amaçla amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Proteinlerin sudaki çözünürlüğü pH ve tuz konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilmektedir. Amonyum sülfat gibi nötral tuzlar protein çözünürlüğü üzerinde iki farklı etkiye sahiptir. Bu tuzlar düşük konsantrasyonlarda elektrostatik protein-protein etkileşimini (bağlama gücünü) önleyerek, proteinin çözünürlüğünü artırmaktadır (salting-in etkisi). Buna karşılık yüksek nötral tuz konsantrasyonlarında, tuzdaki iyonların hidrasyon eğilimi nedeniyle protein çözünürlüğü azalmaktadır (salting-out etkisi). Hücre ekstraktında çözülmüş halde bulunan DPP IV enziminin çözünürlüğünü azaltabilmek ve diğer proteinlerden ayırabilmek için farklı amonyum sülfat oranları (% 40, 50, 60, 70, 80 ve 90) denenmiştir. Kullanılacak amonyum sülfat tuzunun miktarı Tablo 3.5'den belirlenmiş ve tuzun tartımı yapılmıştır.

Tablo 3.5 Amonyum sülfat çöktürmesi tablosu (Dawson ve diğ. 1969)

1 litre çözeltiliye eklenecek amonyum sülfat miktarı (g)																	
Başlangıç kons. (%)	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	112	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	29	57	87	118	151	184	218	258	296	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	263	296	335	376	418
45						0	30	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	235	268	308	348
55								0	31	61	93	127	161	201	235	273	312
60									0	31	62	95	129	168	201	239	279
65										0	32	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	3.3	66	101	137	174
80													0	34	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

Çözelti behere tartılmış belirli miktardaki amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Amonyum sülfatın tamamen çözünmesinden sonra karıştırmaya 30 dakika daha devam edilmiştir ve çöktürme işlemi buz banyosu içerisinde yapılmıştır. Amonyum sülfat tamamen çözüldükten sonra doymuş haldeki çözelti 20000 rcf'te 30 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında pellet ayrılmış ve süpernatant 2. kez aynı santrifüj kuvveti ile santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemleri sonrasında pelletler toplanmış ve 0,1M Tris-HCl tamponu içerisinde çözülmüştür.

3.2.9.4 Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen lizatın içerdiği tuz, iyon değiştirici kolona yüklenmeden önce iyon değiştirici kolonun verimli çalışmasını sağlamak için ilgili proteinden uzaklaştırılmalıdır. Bu nedenle lizat, diyaliz membranı (Membracell 18X, 1000 Da) içerisine alınmıştır. İçerisi lizat ile dolu olan diyaliz membranı 0,1M Tris-HCl içerisinde gece boyunca +4°C'de manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak bekletilmiştir. Diyaliz işlemi ile amonyum sülfat çöktürmesi sırasında protein ile etkileşimde olan tuzun ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır.

3.2.9.5 Kolon kromatografileri

Kolon kromatografisinde 2 faz bulunur. Bunlar; ayrılması istenen moleküllerin içerisinde bulunduğu hareketli faz ve hareketli fazın içerisinden geçtiği durgun fazdır. Kolonun dolgu maddesi yani durgun faz seçilen saflaştırma tipine göre değişiklik gösterir ve bu fazın özellikleri moleküllerin ayrılmasını sağlar. Kolon kromatografisinde durgun fazın molekülleri tutmasına ya da tutmamasına göre moleküller farklı hızlarda kolondan geçerek ayrılırlar. Saflaştırma işlemi molekülün büyüklüğüne, iyon yüküne ya da afinitesine göre yapılabilir. Yaptığımız çalışmada molekül büyüklüğüne göre saflaştırmak için Hiprep 16/60 S300 HR Sephacryl kolonu ve iyon yüküne göre saflaştırma yapmak için Hiprep 16/10 Q FF Sepharose kolonu kullanılmıştır. Kolon kromatografisi ile saflaştırma yapabilmek için kullandığımız cihaz Hızlı performans sıvı kromatografisi (FPLC, Fast protein liquid chromatography) cihazıdır (Şekil 3.3)



Şekil 3.3: FPLC cihazı (Akta-Prime, GE, ABD)

Şekil 3.3'te görüntüsü verilen cihaza kullanılacak kolon takılır ve kolon üretici firma tarafından belirlenen koşullarda şartlandırılır. Şartlandırma işleminden sonra cihaza saflaştırma işlemi için gereken bilgiler girilir. Bu bilgiler; saflaştırılacak örneğin hacmi, örneğin kolondan geçiş hızı, kullanılan tamponların kolondan geçiş hızı, fraksiyonlama hızı, fraksiyon hacmi ve saflaştırma işlemi sırasında kolondaki maksimum basınç değerleridir. Bu bilgiler girildikten sonra saflaştırma işlemi başlatılır. Saflaştırma işlemi cihaza örneğin yüklenmesiyle başlar. Örnek yüklendikten sonra kullanılan tampon ile fraksiyonlama yapılır. Fraksiyonlama sırasında cihazın bağlı olduğu bilgisayar ekranında saflaştırma işlemine ait aminoasitlerin 280 nm'de tespit edilmesiyle kromatogram oluşur.

3.2.9.5.1 Hiprep 16/10 Q FF Sepharose kolonu

Bu kolon, saflaştırma aşamasında iyon değiştirici olarak kullanılmaktadır. Durgun faz % 6 çapraz bağlı agarozdan oluşmaktadır. Ortalama parçacık büyüklüğü 90 µm'dir ve güçlü anyon değiştirici karaktere sahiptir. Saflaştırma işlemine başlamadan önce kolondan 1 kolon hacmi kadar distile su, 5 kolon hacmi kadar elüsyon tamponu geçirilerek kolonun şartlandırılması sağlanmış ve kullanıma hazır hale getirilmiştir. DPP IV enziminin saflaştırılması için uygun olan elüsyon tamponu 50mM Tris-HCl (pH=7,5)'tir ve kolon içinde 0-1 M NaCl ile gradient oluşturulmuştur. Kolona örnek yükleme, yıkama için akış hızı 1 mL/min, fraksiyonlama için ise 3 mL/min ve ortalama basınç 0,14 MPa'dır.

3.2.9.5.2 Hiprep 16/60 S300 HR Sephacryl kolonu

Proteinleri molekül büyüklüklerine göre ayıran kolondur. 2000kDa molekül büyüklüğüne kadar ayırma işlemi yapılabilir. Durgun faz küresel alildekstran ve N,N'-metilen bisakrilamidden oluşmaktadır, ortalama parçacık büyüklüğü 47 µm'dir. Saflaştırma işlemine başlamadan önce kolondan 1,5 kolon hacmi kadar distile su, 2 kolon hacmi kadar tampon geçirilerek şartlandırılmış ve kolon kullanıma hazır hale getirilmiştir. DPP IV enziminin saflaştırması için uygun olan tampon 50mM Tris-HCl (pH:7,5)'dir. Hiprep 16/10 Q FF Sepharose kolondan alınan ve enzim aktivitesi

bulunan fraksiyonlar bu kolona yüklenmiştir. Örnek yükleme, fraksiyonlama akış hızı 0,5mL/min ve ortalama basınç 0,13 MPa'dır.

Yapılan çalışmaların sonuçlarını değerlendirebilmek için spesifik aktivite, verim ve saflaştırma katsayıları hesaplanmıştır. Bu hesaplamaları yaparken kullanılan eşitlikler (3-5) aşağıda verilmiştir.

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{\text{Toplam Enzim Aktivitesi}}{\text{Toplam Protein Miktarı}} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

$$\text{Saflaştırma Katsayısı} = \frac{\text{Fraksiyonun Spesifik Aktivitesi}}{\text{Spesifik Aktivite}} \quad (\text{Eşitlik 4})$$

$$\text{Verim} = \frac{\text{Fraksiyondaki Toplam Enzim Aktivitesi}}{\text{Toplam Enzim Aktivitesi}} \quad (\text{Eşitlik 5})$$

3.2.10 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) anyonik bir deterjan olup iki aminoasitte bir peptit zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Ayrıca (-) yük taşıdığından peptitlere yüksek oranda (-) yük kazandırır. Böylece elektrik yükü açısından karışım içerisindeki bütün protein molekülleri eşit duruma getirilir. Jel konsantrasyonu artırılarak protein moleküllerinin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlanır. SDS-PAGE yöntemi ilgili proteinin saflaştırma basamaklarının izlenmesi, molekül ağırlıklarının saptanması ve konsantrasyon çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir.

Elektroforezin camları isopropanol (2-propanol) ile silinip temizlendikten sonra klipsleri takılmış ve stand üzerine oturtulmuştur. Klipsler ile arasında ince bir boşluk kalan bu iki cam arasına öncelikle ayırma jeli (%8) dökülmüştür (Tablo 3.6).

Ayırma jeli polimerize olmadan üzeri bol miktarda isopropanol ile kaplanmıştır. Yaklaşık 45 dakika polimerizasyon için beklenmiştir. Süre dolduktan sonra ön ayırma jeli hazırlanmıştır (Tablo 3.7).

Tablo 3. 6 SDS -PAGE için ayırma jeli içeriği

Ayrma jeli	% 6	% 8	% 10	% 12	% 15
4 X ayırma tamponu (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
% 30 akrilamid karışımı (mL)	2,0	2,7	3,3	4	5
H ₂ O (mL)	5,4	4,7	4,1	3,4	2,4
% 10 APS (mL)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
TEMED (mL)	0,008	0,006	0,005	0,005	0,005

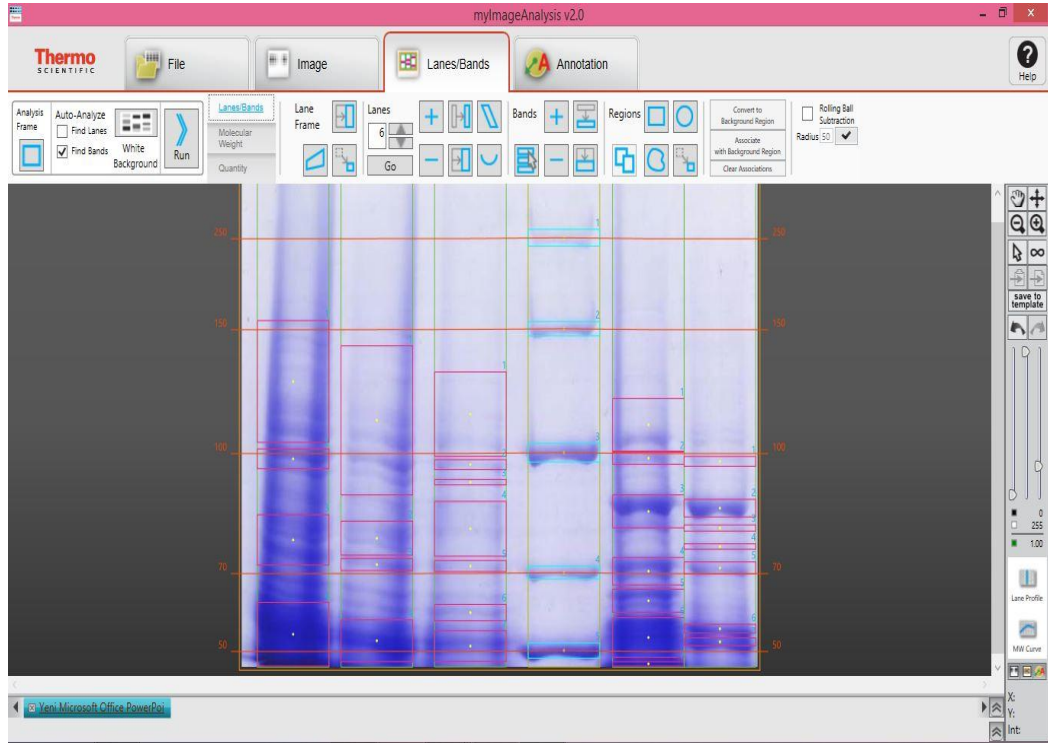
Tablo 3.7 SDS-PAGE için ön ayırma jeli içeriği

Ön ayırma jeli	10 ml	5 ml	2,5 ml
4 X ayırma tamponu (mL)	2,5	1,25	0,625
% 30 akrilamid karışımı (mL)	1,7	0,85	0,425
H ₂ O (mL)	5,7	2,85	1,425
% 10 APS (mL)	0,15	0,75	0,038
TEMED (mL)	0,010	0,005	0,005

Ayrma jeli üzerindeki isopropanol dökülmüş ve ön ayırma jeli polimerize olmadan camların arasına dökülerek hızlıca elektroforezin tarakları takılmıştır. Tarakların açtığı kuyucuklar içinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir. Polimerize olan elektroforez jeli elektroforez cihazı içine yerleştirilmiş, üst ve alt haznesi hazırlanan yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Örnek yükleme işlemine başlamadan önce yüklenmesi planlanan örneklerin protein miktarları hesaplanmıştır. Her kuyuya toplam 40 µg protein vermek için uygun miktarlarda örnekler alınmış ve aseton çöktürmesi işlemi uygulanmıştır. Aseton çöktürmesi için örnekler eppendorf tüplere alınmış üzerlerine hacimlerinin 4 katı kadar soğuk aseton eklenmiş ve 1 gece -86°C'de bekletilmiştir. Bir gece bekleyen tüpler 14000 rcf'te santrifüjlenmiş ve süpernatant ayrılmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen pellet üzerine 10µL örnek yükleme tamponu ve 5 µL distile su ilave edilmiştir. Örnek yükleme tamponu hazırlanırken toplam hacminin % 10'u kadar β-merkaptotanol ilave edilmiştir. Hazırlanan örnekler 90°C'de 5 dakika denatüre edilmiş ve buz içerisine alınmıştır.

Örnekler kuyuya yüklenmeden önce her örneğe 5µl gliserol ilave edilmiştir. Her kuyuya 20µl örnek yüklenmiştir ve kullanılan marker her hangi bir işleme gerek duyulmaksızın (10 µL) direkt olarak yüklenmiştir. Örnek yükleme işlemi sonrasında yürütme işlemine 50 V ile başlanmış ve daha sonra 70 V ile devam edilmiştir. Yürütme işleminden sonra jel camların arasından çıkarılmış ve 15 dakika boyunca fiksasyon çözeltisinde (%10 asetik asit, %25 isopropanol, %65 distile su) bekletilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra Coomassie blue R-250 boyası ile hazırlanan boyama çözeltisinde (500 mL metanol, 100 mL asetik asit, 400 mL distile su, 2,5g cosmassie blue) 1 gece boyanmıştır. Bantlara bağlanmayan boyanın geri alınıp bantların net olarak görülebilmesi için jel boyama işleminden sonra yıkama çözeltisine (785 mL distile su, 165 mL etanol, 50 mL asetik asit) alınmıştır ve yıkanan jelin görüntüsü alınmıştır.

Alınan jel görüntüsü Thermo Scientific firmasının bir yazılımı olan ‘My Image Analysis (v 2.0)’programına yüklenmiştir. Kullanılan programın ekran görüntüsü Şekil 3.4’de gösterilmiştir.



Şekil 3.4: ‘My Image Analysis’programına ait ekran görüntüsü

Şekil 3.4'te görüldüğü gibi Thermo Scientific firmasının myImageAnalysis (v2.0) yazılımı ile bantların kapladığı alan ve her bantın intensitesi kullanılarak proteinin saflığı test edilmiş aynı zamanda molekül ağırlığı ve proteinin bağıl göç mesafesi (Rf, Relative font) değerleri analiz edilmiştir.

3.2.11 Kütle Spektrometrisi ile Protein Kimlik Tayini

Jel filtrasyon kolonundan alınan fraksiyona kütle spektrometresi ile protein kimlik tayini yapılmıştır. Analiz 'Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Proteomiks Laboratuvarı'nda (İstanbul) yaptırılmıştır. Uygulamada kullanılan metotlar aşağıda belirtilmiştir.

Jel-içi Protein Kesim İşlemi: Protein örnekleri SDS-PAGE jelde coomassie blue R-250 ile boyandıktan sonra, seçilen bantlar bistüri ile eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Önce yıkama solüsyonunda (%50 metanol ve %5 asetik asit) sonra destaining solüsyonunda (50 mM amonyum bikarbonat ve %50 asetonitril) mavi renk kaybolana kadar işlem yapılmış, jel parçaları 200 µL asetonitril içerisinde kurutulup üzerlerine 10 mM dithiotreitol ve sonrasında 100 mM iodoasetamid konularak 'Protein Reduction and Alkylation' işlemi tamamlanmıştır. 'Protein Digestion' işlemi için tripsin solüsyonu (20 ng/µL) konularak etüvde 16 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. 'Peptide Extraction' işlemi için ekstraksiyon solüsyonu (%50 asetonitril ve %5 formik asit) kullanılarak son hacim, vakumlu santrifüjde 20 µL'ye kadar düşürülmüştür.

Kütle Spektrometrisi ile Protein Kimlik Tayini: Hazırlanan örnekler, nano-sıvı kromatografisi olarak Thermo Dionex™ UltiMate™ 3000 RSLC nano sisteminde 'Pre-concentration onto a Nano Column' set-up içinde 75 µm I.D. x 15 cm, Acclaim PepMap RSLC C18, 2 µm, 100Å kolonu kullanılarak ayrıştırılmıştır. (Mobil faz A: % 100 su + % 0.1 formik asit, mobil faz B: %100 asetonitril + %0.1 formik asit, yükleme solüsyonu: % 95/5 (v/v) su/asetonitril ve % 0.1 TFA). Cihaza 0.300 µL/min akış verilmiştir (kullanılan gradient: 50 dakika'da mobil faz B % 5'den % 40'a, 55. dakika'da % 95, 65.dakika'da %5 ve sonraki 10 dakika şartlandırma). Ayrıştırılan peptit örnekleri, yüksek çözünürlüklü Bruker Compact kütle spektrometrisinde, MS, (CaptiveSpray NanoBooster-Electrospray-UHR-Quadrupole-Time-of-Flight) analiz

edilmiştir. Tüm sistem arayüz kontrolü için HyStar 3.2 programı, MS kontrolü için otofControl ver:3.3 programı, analiz sonucunda .mgf dosyasının dönüşümü için Compass Data Analysis programı ve Mascot 2.4.1 aracılığıyla NCBI nr ve SwissProt veri bankalarına erişip bu dosya ile protein kimlik tayini yapmak için Biotoools 3.2 programı kullanılmış ve analiz sonucu elde edilmiştir.

3.2.12 Enzim karakterizasyonu

Enzim üretimi çalışmalarında bol miktarda ve ekonomik üretim hedeflemenin yanı sıra elde edilen enzimin kinetik özelliklerinin belirlenmesi de önem arz etmektedir. Kinetik çalışmalar ile enzimin substratı ne oranda hidrolize ettiği, reaksiyonun hızı, reaksiyon hızının sıcaklık, pH değişimleri ve metal iyonlarının varlığı ile nasıl etkilendiği, enzim için spesifik substratların ne olduğu, hidroliz ürünlerinin enzime inhibisyon etkisi yapıp yapmadığı, yapıyor ise bu inhibisyon çeşidinin ne olduğu, son ürün için kullanılan ingredientlerin inhibisyon etkilerinin belirlenmesi ortaya konmaktadır. Çalışmamızda sırası ile optimum sıcaklık, optimum pH değerleri, enzime spesifik substrat, ve inhibitör maddelerin etkisi belirlenmiştir.

3.2.12.1 DPP IV enziminin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Enzimin termal stabilitesini belirleyebilmek için enzim solüsyonları 15 dakikalık inkübasyon sürelerinde 0°C'den 50°C'ye kadar sıcaklığa maruz bırakılmıştır ve örneklerin enzim aktiviteleri yukarıda 'DPP IV enzim aktivitesinin ölçülmesi ve standart eğri çizimi' bölümünde anlatıldığı şekilde ölçülmüştür (Buckley ve diğ. 2004).

3.2.12.2 DPP IV enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi

Enzimin pH profilini belirlemek amacı ile pH 3,0'den 10,0'a kadar değişen aralıktaki pH değerlerine sahip solüsyonlar (Tris-HCl) kullanılarak enzim solüsyonları 37°C'de 15 dakika Gly-Pro- p-nitroanilide ile inkübe edilmiş ve enzim

aktiviteleri yukarıda ‘DPP IV enzim aktivitesinin ölçülmesi ve standart eğri çizimi’ bölümünde anlatıldığı şekilde ölçülmüştür (Buckley ve diğ. 2004).

3.2.12.3 Enzim substrat spesifikliğı

Enzim substrat spesifikliğini belirlemek için değışen substrat konsantrasyonuna göre reaksiyon hızının belirlenmesi gerekmektedir. Reaksiyon hızını belirlemek için iki metot bulunmaktadır bunlardan birisi spektrofotometrik yöntem diğeri ise florometrik yöntemdir. Çalışmamızda spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. DPP IV enziminin substrat spesifikliğini belirlemek için Gly-Pro-p-nitroanilide ve Ala-Pro-p-nitroanilide substratları kullanılmıştır. Kullanılan substratların konsantrasyonları 0,1 mM ile 1,4 mM arasında değışmektedir. Mikroküvet içerisine 100 µL saflaştırılan DPP IV enzimi ve belirlenen konsantrasyonda 100µL substrat aktarılmıştır. 37°C’de 15 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her küvete 100 µL asetik asit (1,5M) eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve 405 nm’de enzim aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Michaelis-Menten kinetik modeli ve Lineweaver-Burk modelleri kullanılarak yorumlanmıştır.

3.2.12.4 Enzim inhibisyonu

DPP IV enzimi için Gly-Pro-Phe, Gly-Pro-Ile, Phe-Val-Val-Asn-Ala peptit dizilerinin ve PMSF, EDTA, metal iyonlarının (Mg^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2}) inhibitör etkileri belirlenmiştir. PMSF inhibitörünün DPP IV enziminin aktif bölgesindeki serin amino asitini inhibe ettiği düşünülmektedir. Metal iyonları ise çevresel şartların DPP IV enzimini nasıl etkilediğini gözlemlemek için kullanılacaktır. İnhibitör denemeleri için Gly-Pro-p-nitroanilide substrat olarak kullanılmıştır. Kullanılan substratın konsantrasyonu 0,1mM ile 1,4 mM arasında değışmektedir. Hazırlanan inhibitör maddelerin konsantrasyonu 1mM’dir. Örnekler eppendorf tüpler içerisinde hazırlanmıştır. 100 µL substrat, 100 µL inhibitör ve 100 µl saflaştırılan DPP IV enzimi eppendorf tüpü içerisine aktarılmış, 37°C’de 15 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her tüpe 100 µl asetik

asit (1,5M) eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve 405nm’de enzim aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk kinetik modelleri kullanılarak yorumlanmıştır.

3.2.13 Ticari enzimlerin enzim aktivitelerinin kontrolü

Yurt dışı pazarında ‘gıda takviyesi’ adı ile üretilen DPP IV enzimleri; tek bir enzim, farklı proteaz enzimleri ile desteklenerek veya lipaz, proteaz ve amilaz enzim kokteyli olarak toz formda, kapsül, tablet ya da çiğnenebilir tabletler olarak satışa sunulmaktadır. Bu enzim preparatları (tabletleri) TÜBİTAK (113Z841) projesinin bütçesi kullanılarak satın alınmış ve Tablo 3.8’de verilmiştir. Tabletler 15 mL Tris-HCl (pH:8,0) tampon içerisinde çözülmüştür. Bu işlem sonrasında oluşan süspansiyon bulanık bir halde olduğundan enzim aktivitesi tayini yapılabilmesi için 8000 rc’te 15 dakika süresince santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında safsızlık unsurları pellet halinde tüpün dibinde birikirken, alınan süpernatantlara ilgili metodumuza göre enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar ürettiğimiz DPP IV enzimi ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 3.8 Piyasada satışı yapılan ticari enzimler ve kaynakları

Enzim örnekleri	Mikrobiyal kaynak
Enzymatic therapy/Gluten defense	-
Now foods/Gluten digest	<i>Aspergillus oryzae</i>
Swanson health products/BioCore DPP IV	<i>Aspergillus oryzae</i>
Country life/Gluten-zyme	-
Enzymedica Inc./ GlutenEase	-
Emerald lab./ Digestive health	-
Brain Child Nutritionals/Basic support prob.	<i>Lactobacillus acidoplilus</i>
Elite science/Digestive Enzymes Ultra chewable	-
Klaire labs./ Vital-zymes chewable	-

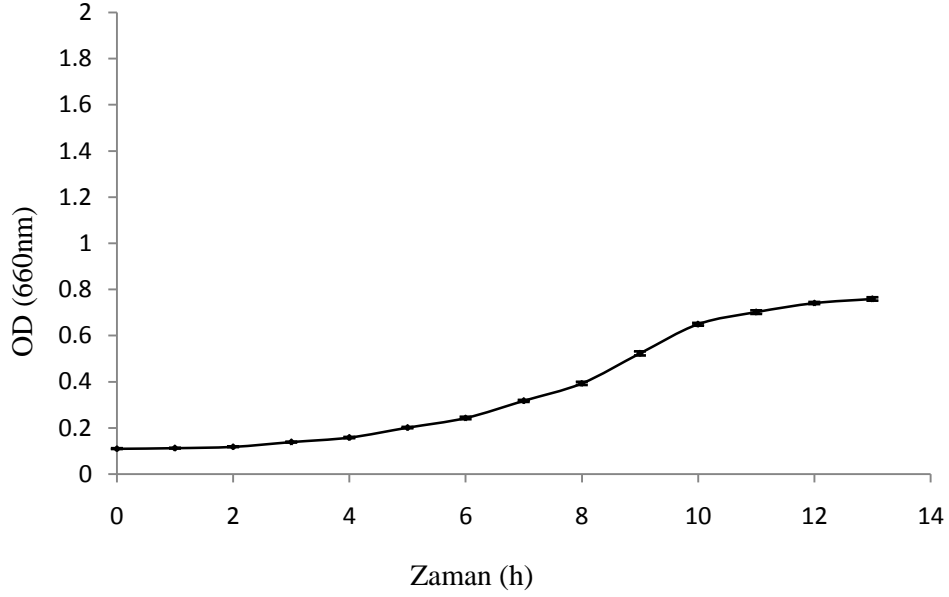
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Mikroorganizmaların inokülasyon oranlarının belirlenmesi

Alınan sonuçlara göre %1'lik (v/v) inokülasyon oranı denemesinde maksimum spesifik büyüme hızı 9. saatte gözlemlenmiştir ve başlangıçtaki spesifik büyüme hızı bu zaman diliminde 14,5 katına çıkmıştır. Bununla birlikte *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun durağan faza girmesi yani maksimum hücre sayısına ulaşması için 13 saate ihtiyaç vardır. Yapılan %1'lik inokülasyon denemesi sonucunda *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun büyüme kinetiği verileri Tablo 4.1'de sonuçlardan oluşturulan grafik Şekil 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 %1'lik inokülasyon oranında *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun büyüme kinetiği verileri

Zaman (h)	OD (660nm)	Hücre sayısı (x10 ⁷ kob/mL)	Spesifik büyüme hızı (h ⁻¹)
0	0,110	0,887	
1	0,112	0,905	0,019
2	0,118	0,952	0,050
3	0,138	1,114	0,157
4	0,158	1,273	0,133
5	0,201	1,622	0,241
6	0,243	1,957	0,188
7	0,317	2,553	0,265
8	0,392	3,164	0,214
9	0,522	4,211	0,285
10	0,649	5,228	0,216
11	0,701	5,652	0,078
12	0,741	5,970	0,054
13	0,758	6,112	0,023



Şekil 4.1: %1'ik inokülasyon sonucunda *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun zamana göre OD değişimi

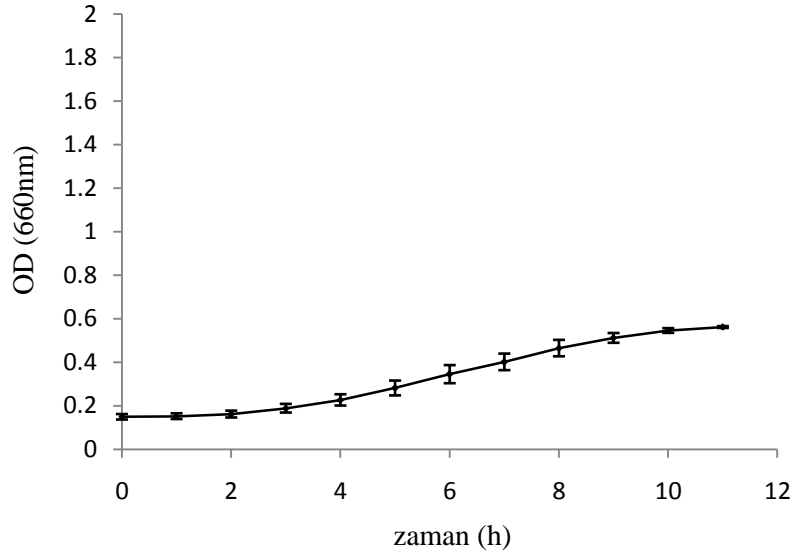
Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'de görüldüğü gibi bu inokülasyon oranı ile çalışıldığında inokülasyon için en uygun zamanın eksponansiyel fazın ortası olduğu gözönüne alındığında yeni üretim ortamına inokülasyon yapılabilmesi için 9. saatin uygun olduğu görülmektedir. Yapılan %2'lik inokülasyondan alınan sonuçlara göre maksimum spesifik büyüme hızı % 1 'lik inokülasyon oranına göre 4 saat daha erken gelerek 5. saatte gözlemlenmiştir ve başlangıçtaki spesifik büyüme hızınının 11,8 katına çıkmıştır. Çalışmada kullanılan suşun bu inokülasyon oranı ile durağan faza geçmesi için 9-10 saat gerekmektedir. Alınan sonuçlar Tablo 4.2 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2 %2'lik inokülasyon oranında *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun büyüme kinetiği verileri

Zaman(h)	OD (660nm)	Hücre sayısı ($\times 10^7$ kob/mL)	Spesifik büyüme hızı (h^{-1})
0	0,148	1,198	
1	0,151	1,220	0,018
2	0,161	1,298	0,062
3	0,188	1,515	0,154

Tablo 4.2 (devam)

4	0,226	1,823	0,185
5	0,281	2,264	0,216
6	0,344	2,775	0,204
7	0,401	3,230	0,152
8	0,464	3,741	0,147
9	0,511	4,117	0,096
10	0,545	4,390	0,064
11	0,561	4,520	0,029

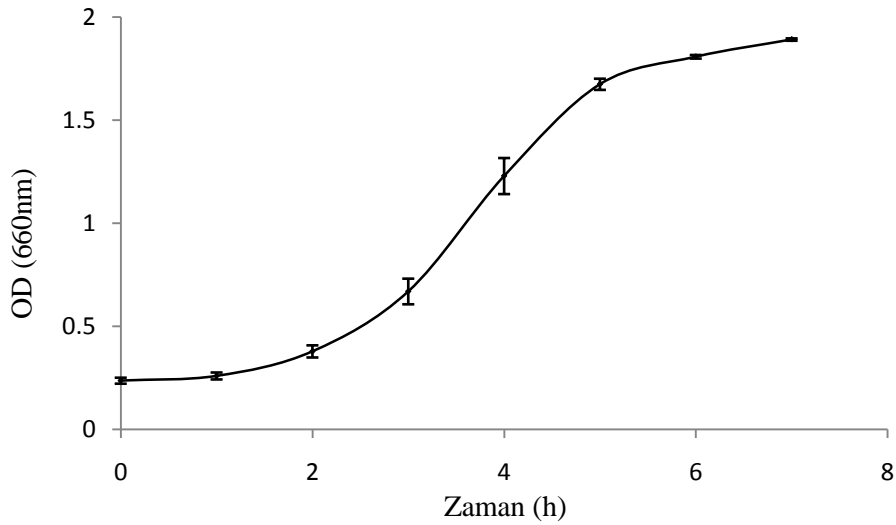


Şekil 4.2.% 2'lik inokülasyon sonucunda *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun zamana göre OD değişimi

Yüzde 5'lik *Lactococcus lactis* spp. *lactis* inokülasyon denemesi sonuçları % 1 ve % 2 'lik inokülasyon sonuçlarına göre daha yüksek spesifik büyüme hızı vermiştir (4. saatte) ve kullanılan suşun durağan faza geçme süresi 6 saattir (Tablo 4.3 ve Şekil 4.3).

Tablo 4.3 %5'lik inokülasyon oranında *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun büyüme kinetiği verileri

Zaman (h)	OD (660nm)	Hücre sayısı (x10 ⁷ kob/mL)	Spesifik büyüme hızı (h ⁻¹)
0	0,237	1,443	
1	0,260	1,582	0,091
2	0,379	2,307	0,376
3	0,670	4,074	0,568
4	1,223	7,477	0,607
5	1,674	10,181	0,308
6	1,808	10,993	0,076
7	1,891	11,501	0,045



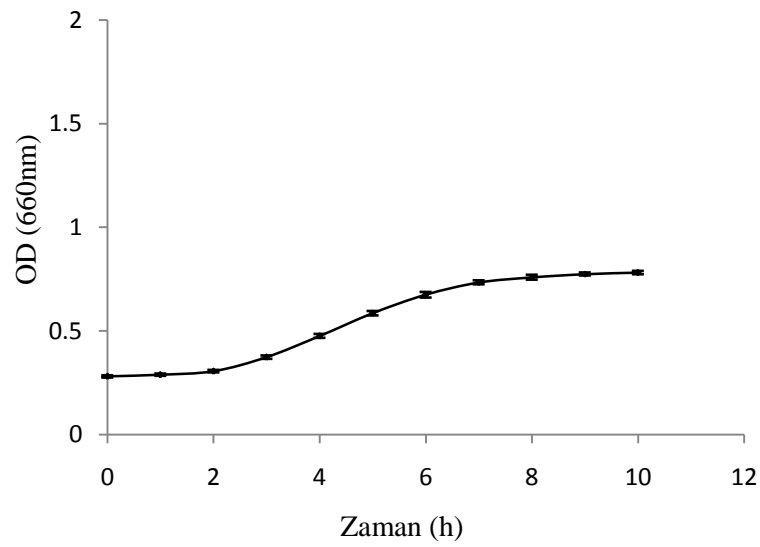
Şekil 4.3: % 5'lik inokülasyon sonucunda *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun zamana göre OD değişimi

Tablo 4.3 ve Şekil 4.3'te görüldüğü gibi %5'lik *Lactococcus lactis* spp. *lactis* inokülasyonu ile 7 saat içinde toplam 11,5x10⁷kob/ml hücre sayısına ulaşılmış ve 4 saat içinde suş inokülasyon için hazır hale gelmiştir. Deneye %10'luk inokülasyon

denemesi ile devam edildiğinde *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun durağan faza geçme süresinin 8 saate çıktığı görülmüştür (Tablo 4.4 ve Şekil 4.4).

Tablo 4.4 %10'luk inokülasyon oranında *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun büyüme kinetiği verileri

Zaman (h)	OD (660nm)	Hücre sayısı ($\times 10^7$ kob/mL)	Spesifik büyüme hızı (h^{-1})
0	0,280	2,263	
1	0,289	2,33	0,029
2	0,306	2,468	0,057
3	0,374	3,011	0,198
4	0,476	3,837	0,242
5	0,586	4,719	0,207
6	0,674	5,435	0,141
7	0,735	5,918	0,085
8	0,759	6,118	0,033
9	0,775	6,243	0,020
10	0,782	6,298	0,008



Şekil 4.4. % 10'luk inokülasyon sonucunda *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun zamana göre OD değişimi

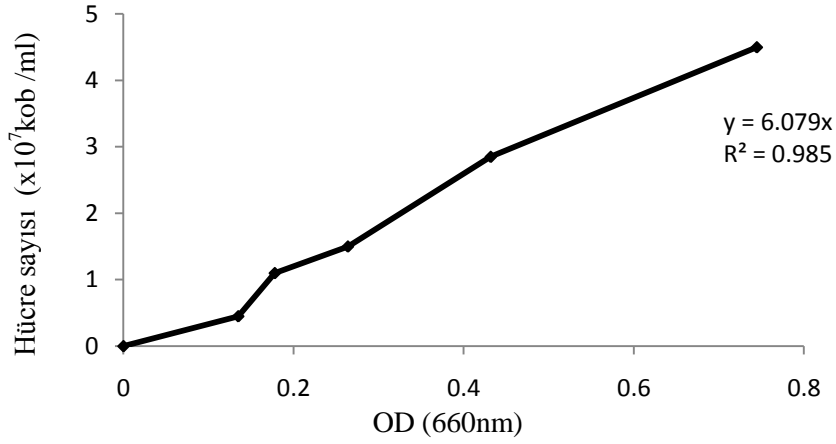
Yapılan inokülasyon oranı denemelerinden alınan sonuçlara göre *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun (NRRL-1821) farklı inokülasyon oranları farklı büyüme kinetikleri ortaya koymuştur. Bu büyüme kinetiği verileri karşılaştırıldığında % 5 inokülasyon oranı ile 6.saatte durağan faza giren suşun $0,607 \text{ h}^{-1}$ spesifik büyüme hızı ile $11,5 \times 10^7$ kob/mL hücre sayısına ve 1,808 OD'ye ulaşıldığı sonucuna varılmış ve deneylere %5 inokülasyon oranı ile devam edilmesine karar verilmiştir. Alınan sonuçlara göre %5'lik *Lactococcus lactis* spp. *lactis* inokülasyon denemesi sonuçları % 1 ve % 2'lik inokülasyon sonuçlarına göre daha yüksek spesifik büyüme hızı vermiştir (4. saatte) ve kullanılan suşun durağan faza geçme süresi 6 saatte olup bu süre sonunda ulaşılan hücre sayısı $11,5 \times 10^7$ kob/mL'dir. Bu değerler dikkate alındığında *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun M17 broth ortamına inokülasyon oranının %5 olmasına karar verilmiştir.

4.2 OD₆₆₀-kob/mL korelasyonu (Lineer regresyon analizi)

Çalışmamızda kullandığımız *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun optik yoğunluğu ile 48 saat inkübasyondan sonra oluşturduğu koloni sayıları arasında ilişki incelenmiştir ve lineer regresyonu $y=ax+b$ denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Tablo 4.5'de optik yoğunluğa karşılık gelen hücre sayısı verilmiştir. Şekil 4.5'te ise alınan sonuçlardan doğrusal eğri oluşturulmuştur.

Tablo 4.5 OD₆₆₀ değişimine karşı hücre sayısı değerleri

OD (660nm)	Hücre sayısı ($\times 10^7$ kob/mL)
0	0
0,135	0,45
0,178	1,10
0,264	1,50
0,432	2,85
0,745	4,50



Şekil 4.5: OD₆₆₀ değişimine karşı hücre sayısının lineer regresyon eğrisi

Şekil 4.5'te görülen lineer regresyon eğrisi ile elde edilen $y=6,079x$ denklemi ($R^2= 0,99$) 660 nm'lik dalga boyunda optik yoğunluğu ölçülen *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşunun hücre sayılarını göstermektedir. Bu analizden sonra ele edilen denklem kullanılarak tüm denemelere aynı hücre sayısı ile başlanmıştır.

4.3 Sonikatör ile hücre parçalanması optimizasyonu

Lactococcus lactis spp. *lactis* suşu Gram-pozitif olması nedeni ile sahip olduğu kalın peptidoglukan hücre duvarı ve kok şeklinde olması bu suşun ılımlı parçalama metotları kullanarak parçalanmasını zorlaştırmaktadır (Perez-Guzman 2004, Saboya 2003). Sonikasyon işleminin optimizasyonu için Design Expert (Stat-Ease, v9.0) programında değişken sayımıza uygun olması nedeni ile BBD tasarımı uygulanmıştır.

Tablo 4.6 BBD tasarımı için kullanılan faktörlerin değerleri

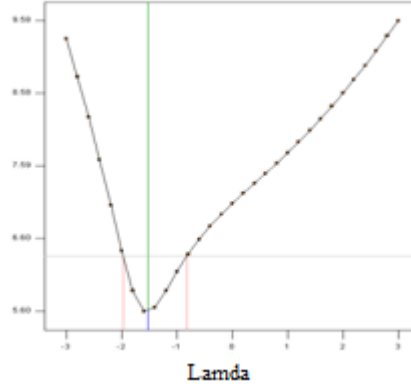
Faktör seviyesi	-1	0	+1
Zaman (min)	0,5	15,25	30
Güç (%)	10	55	100
Döngü	1	4	7

Tablo 4.6’da maksimum ve minimum değerleri verilen üç faktörün seviyeleri (-1, 0, 1) görölmektedir. Programda BBD deney planına göre oluşturulan parçalama işlemleri 15 deney sayısı ve 3 merkez noktayı tanımlamıştır. Deney sonucunda elde edilen sonuçlar programdaki yanıt (response) kısmına girilmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7 BBD tasarımına göre faktör seviyeleri ve yanıtları

	Faktör 1: Zaman (min)	Faktör 2: Güç (%)	Faktör 3: Döngü	Yanıt: Enzim Aktivitesi (mU/mL)
1	0,5	10	4	25,36
2	15,25	55	4	120,93
3	0,5	55	1	25,49
4	30	55	7	120,79
5	15,25	100	1	67,54
6	30	10	4	127,2
7	0,5	55	7	32,03
8	30	55	1	96,5
9	15,25	10	7	113,05
10	15,25	55	4	156,03
11	15,25	55	4	116,79
12	15,25	10	1	49,38
13	15,25	100	7	129,87
14	30	100	4	126,93
15	0,5	100	4	30,03

Tablo 4.7’de BBD tarafından önerilen deney düzeneği uygulandıktan sonra alınan cevaplar ile yapılan veri analizi sonucunda analiz kısmında bağımsız ve bağımlı değişkenler ilişkilendirilerek RSM eşitliği kurulmuştur. Oluşturulan eşitliği düzeltmek için Şekil 4.6’da görölen bir düzeltme faktörü olan lambda -1.51 değeri ile düzenlenmiş ve düzgün bir ANOVA elde edilmiştir.



Şekil 4.6: RSM eşitliği için düzeltme faktörü

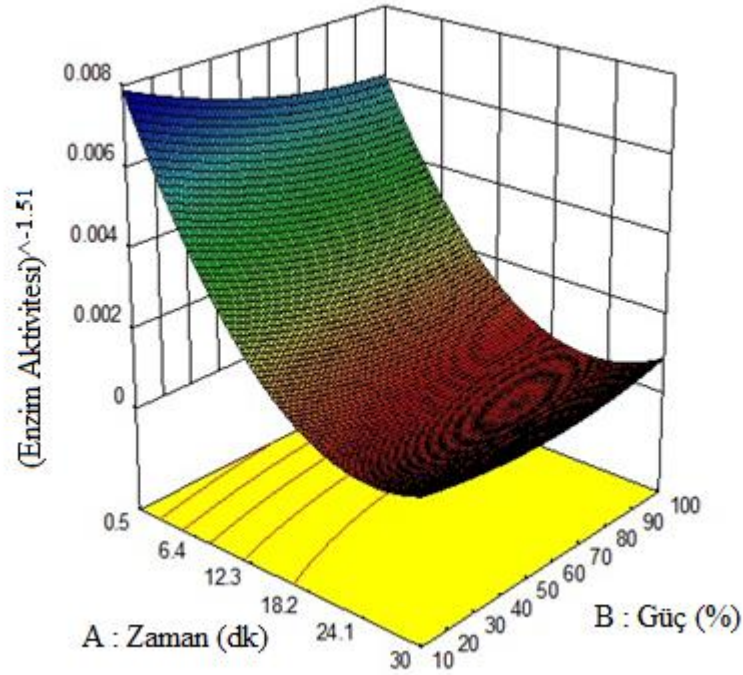
$$Y= 0,010045-0,00919A-0,0025B-0,00311C + 0,000512AB + 0,000624AC + 0,000341BC + 0,002614A^2 + 0,000615B^2 + 0,00064C^2(\text{gerçek faktör}) \quad (\text{Eşitlik 6})$$

Bu eşitlikte; A:zaman, B:güç, C:döngü, Y: DPP IV enzim aktivitesini ifade etmektedir. Kullanılan eşitlik 2. dereceden bir polinomdur. Alınan sonuçların varyans analizi (ANOVA) Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.8 Varyans analizi tablosu

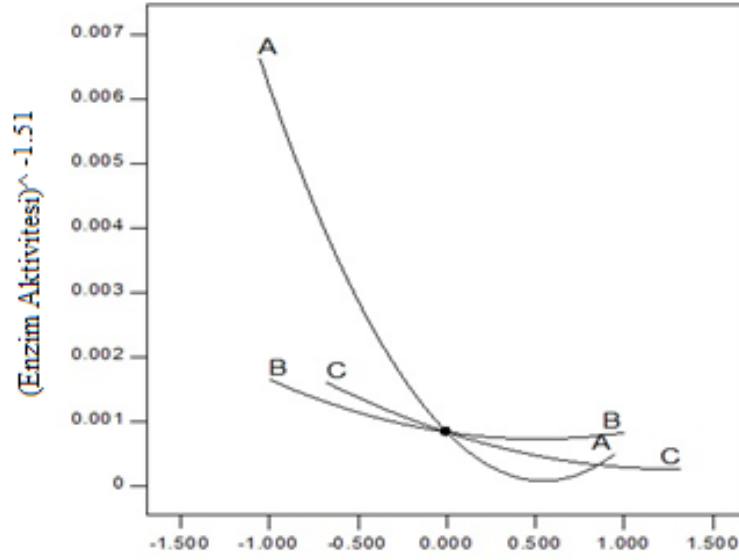
Yanıt: 1		Enzim aktivitesi		Sabit	0
Dönüşüm : güç		Lamda: -1.51			
Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	p-değeri Prob > F
Model	1,023E-004	9	1,137E-005	316,07	<0,0001*
A-zaman	6,757E-005	1	6,757E-005	1878,38	<0,0001
B-güç	1,051E-006	1	1,051E-006	29,22	0,0017
C-döngü	3,845E-006	1	3,845E-006	106,88	<0,0001
AB	7,309E-007	1	7,309E-007	20,32	0,0041
AC	9,068E-007	1	9,068E-007	25,21	0,0024
BC	200E-007	1	2,000E-007	5,56	0,0564
A ²	2,674E-005	1	2,674E-005	743,46	<0,0001
B ²	7,240E-007	1	7,240E-007	20,13	0,0042
C ²	5,581E-007	1	5,581E-007	15,51	0,0076
Artan	2,158E-007	6	3,597E-008		
Model uygunsuzluğu	1,991E-007	3	6,636E-009	11,87	0,0359*
Hata	1,676E-008	3	5,588E-009		
Toplam korelasyon	1,025E-004	15			
Standart sapma	1,897E-004		R ²	0,9979	
Ortalama	2,377E-003		Düzeltilmiş R ²	0,9947	
Varyasyon katsayısı %	7,98		Tahmini R ²	0,9686	
PRESS	3,215E-006		Yeterli hassasiyet	48,011	

Tablo 4.8’de verilen varyans analizi sonuçlarına göre zaman, döngü ve güç değerleri sırası ile önemli bulunmuştur ve 316,07 olduğu görülen model F değeri, modelin anlamlı olduğunu; 11,87 olan uyumsuzluk F değeri ise görülen bu uyumsuzluğun anlamsız olduğunu veya ihmal edilebileceğini göstermektedir. 0,05’ten küçük olan “Prob>F” değerleri veya p-değerleri model terimlerinin anlamlı olduğunu gösterir. Bulunan R² değeri 0,9979’dur ve bu değer modelin uygun olduğunu göstermiştir. Değişkenler arasındaki etkileşimin cevap ile ilişkisi Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Zaman, güç ve enzim aktivitesi için 3 boyutlu grafik

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi enzim aktivitesi üzerinde zamanın etkisi gücün etkisine oranla daha fazladır. 18.2 dakikadan sonra enzim aktivitesindeki artış maksimum düzeye yaklaşmaktadır. ANOVA (varyans analizi) sonuçlarındaki zamana ait F-value değeri güç değerinden yaklaşık 70 kat daha fazladır. Bu grafikte de zamanın daha etkili bir parametre olduğu gözlenebilmektedir. Döngü ve güç değişkenleri enzim aktivitesi üzerinde birbirlerine yakın oranlarda etkilidir. İlgili parametrelerin etkileşimi Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8. Zaman, döngü ve güç değişkenlerinin pertürbasyon grafiği

Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de görüldüğü gibi yapılacak olan optimizasyon çalışmasında uygulama süresi enzim aktivitesini daha fazla etkilemektedir. İstatistiksel optimizasyon sonucunda optimum parametre setleri için aday değerler Design Expert programının final bölümünde sunulmuştur. Bunların içersinden sistemi en iyi tanımlayan ve uygulamada en kullanışlı (deneysel olarak uygulanabilir) olan set önermelerinden biri olan optimum parametre değerleri süre 28 dakika, güç %91 ve döngü 3 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel optimizasyon sonuçları sisteme girildikten sonra sistemin bize verdiği parametreler ve bu parametrelere karşılık gelen tahmini enzim aktivitesi değerleri Tablo 4.9’ da görülmektedir.

Tablo 4.9 İstatistiksel optimizasyon sonuçlarına karşılık sistemin verdiği parametreler, tahmini enzim aktivitesi değerleri ve analiz sonuçları

Deney Setleri	Parametreler			Enzim aktivitesi		
	Zaman	Güç	Döngü	Hesaplanan	Tahmin Edilen	Fark (%)
1	15	71	6	175.097	151.897	+ 15.3
2	28	91	3	156.074	145.090	+ 7.6
3	29	20	4	162.397	137.348	+ 18.2

Tablo 4.9’da görülen parametreler ile deneyler yapılmıştır. Alınan sonuçlar ve tahmini değerler karşılaştırılmış, iki değer arasındaki farkın en az olduğu parametreler optimum parametreler olarak seçilmiştir.

4.4 Santrifügal filtrasyon (Ultrafiltrasyon)

Parçalama işleminden sonra tampon içerisinde bulunan enzim ilk önce 50kDa molekül ağırlığına sahip santrifügal filtreden ve ardından 100kDa molekül ağırlığına sahip santrifügal filtreden geçirilmiştir. Yapılan filtrasyon işleminin sonucunda permeat ve retentat kısımlarına enzim aktivitesi tayini yapılmış ve retentat kısımdaki toplam enzim aktivitesinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu işlem sonucunda DPP IV enzim konsantrasyonu arttırılmıştır. Başlangıçta 34630,53 mU olan toplam enzim aktivitesi 100kDa’luk filtreninretentat kısmında 29794,99 mU olmuştur ve hacim 100mL’den 75mL’ye azaltılarak konsantrasyonun artması sağlanmıştır.

4.5 Amonyum sülfat çöktürmesi

Protein çözeltisine çok miktarda nötral tuz ilave edildiğinde, proteinlerin genellikle iç kısımlarında yer alan hidrofobik gruplar etrafındaki su molekülleri tuz iyonları tarafından uzaklaştırılır, bu durumda hidrofobik grupların birbirleri ile olan etkileşimleri artar ve proteinler çöker. Bu şekilde çöken protein genellikle denatürasyona uğramadığından aktivite pelletin uygun tamponda çözülmesiyle geri kazanılır. Bu işlem ile çöktürülmek istenen protein için gerekli olan tuz miktarı belirlenir ve çalışılan proteinin süspansiyon içindeki konsantrasyonun arttırılması ve hacmin azaltılması sağlanır (Erarslan ve diğ. 2001). Saflaştırmanın sonraki basamakları için küçük hacimde ve yüksek konsantrasyonda çalışmak avantaj sağlar. Çalışmamızda DPP IV enzimi için çöktürme denemeleri yapılmıştır. Yapılan çalışmalar Tablo 4.10’da verilmiştir.

Tablo 4.10 DPP IV enziminin amonyum sülfat tuzu ile çöktürme oranları ve enzim aktivitesi sonuçları

Örnek	Toplam enzim aktivitesi (mU/mL)	Toplam protein miktarı (mg/mL)	Spesifik aktivite (mU/mg)
% 0	2791,577	22	126,889
%60 çökelti	236,574	3,25	72,792
%70 çökelti	904,305	2,475	365,376
%80 çökelti	1024,662	3,15	325,289
%90 çökelti	1000,709	6,6	151,622
%60 süpernatant	1117,814	16,875	66,240
%70 süpernatant	1550,745	12,65	122,588
%80 süpernatant	596,167	12	49,680
%90 süpernatant	709,723	10	70,972

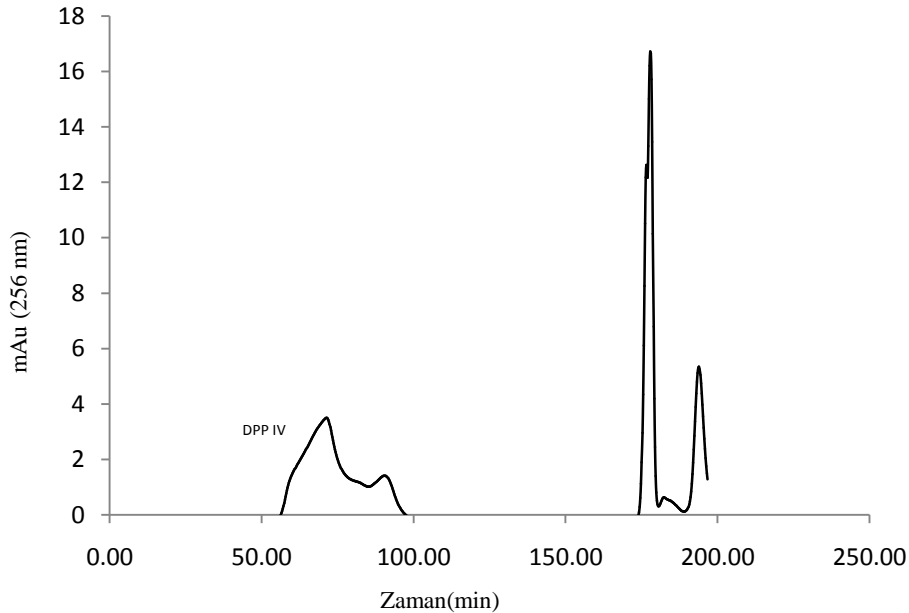
Tablo 4.10'da görüldüğü gibi analizler sonucunda çökelti içinde DPP IV spesifik aktivitesinin en yüksek olduğu tuz konsantrasyonu % 70 olarak belirlenmiştir. Bu değer DPP IV enzimi için uygun olduğu tespit edilmiş analizlerimize bu tuz konsantrasyonunda çöktürmeler ile devam edilmiştir. DPP IV enziminin saflaştırılması için uygulanan kolon kromatografisinden öncesinde enzimin konsantrasyonunun artırılması için amonyum sülfat çöktürmesi yapılmaktadır. Çöktürme işleminde kullanılacak amonyum sülfat tuzunun oranı belirlenmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında çöktürme için kullanılan tuz oranlarının %40 ile %80 arasında olduğu görülmüştür (Sanz ve Toldra 2001, Goldstein ve diğ. 2001, Degraeve ve Martial-Gros 2003). Belirtilen tuz oranları dikkate alınarak çalışmamızdaki amonyum sülfat tuzu oranları denenmiştir ve yapılan analizler sonucunda *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşundan elde edilen DPP

IV enzimi için uygun olan amonyum sülfat tuzu oranının %70 olmasına karar verilmiştir.

4.6 Kolon kromatografileri

Amonyum sülfat çöktürmesi ve tuzun giderilmesi için uygulanan diyaliz işleminden sonra örnekler kolonlara yüklenerek saflaştırma işlemleri yapılmıştır. Saflaştırma basamakları her adımda protein konsantrasyonu ve enzim aktivitesi tayini yapılarak izlenmiştir. Bu analizlerin sonuçlarına göre ise spesifik aktivite, verim ve saflaştırma katsayısı hesaplanmıştır (Tablo 4.11).

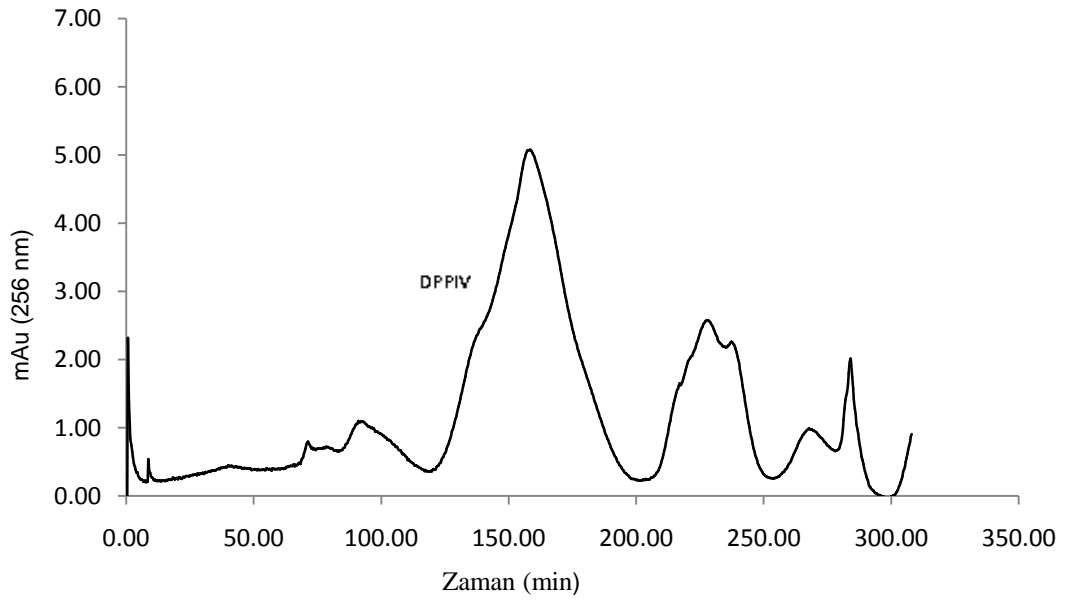
Yapılan saflaştırma sonucunda anyonik özellik gösteren DPP IV enzimi anyon değiştirici kolondan geçirildikten sonra Şekil 4.9'daki kromatograma sahip olmuştur. Şekil 4.9'da görülen ve pik yapan fraksiyonlarda enzim aktivitesi ölçülmüş ve bu fraksiyonların içinden 11. fraksiyonda DPP IV toplam enzim aktivitesi 8593,93 mU (5mL için) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.9 Hiprep 16/10 Q FF sepharose kolonunun kromotogramı

İlgili fraksiyon proteinleri molekül büyüklüğüne göre ayırmak için tasarlanan ve bir jel filtrasyon kolonu olan Hiprep 16/60 S300 HR Sephacryl kolonuna

yüklenmiştir. Jel filtrasyon kromatografisinde küçük moleküller kolon içerisindeki katı matrikstekiporlara tutunurken büyük moleküller porlara tutunmadan kolon içerisinden akıp geçer böylece büyük moleküller kolonu kısa sürede terk ederken küçük moleküllerin kolonu terk etme süresi daha uzundur. Bu farktan yararlanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilir. Kolondan elde edilen kromatogram Şekil 4.10'da verilmiştir. Kromatogramda pik veren fraksiyonların içinden 14. fraksiyonda DPP IV enzim aktivitesi görülmüştür ve bu fraksiyonun taşıdığı toplam enzim aktivitesi değeri 2634,93 mU (5 mL için) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.10 Hiprep 16/60 S300 HR Sephacryl kolonunun kromatogramı

Çalışmada yapılan tüm kromatografi denemelerinde DPP IV enzim aktiviteleri Hiprep 16/10 Q FF Sepharose kolonunda 11. fraksiyonda, Hiprep 16/60 S300 HR Sephacryl kolonunda ise 14. fraksiyonda görülmüştür.

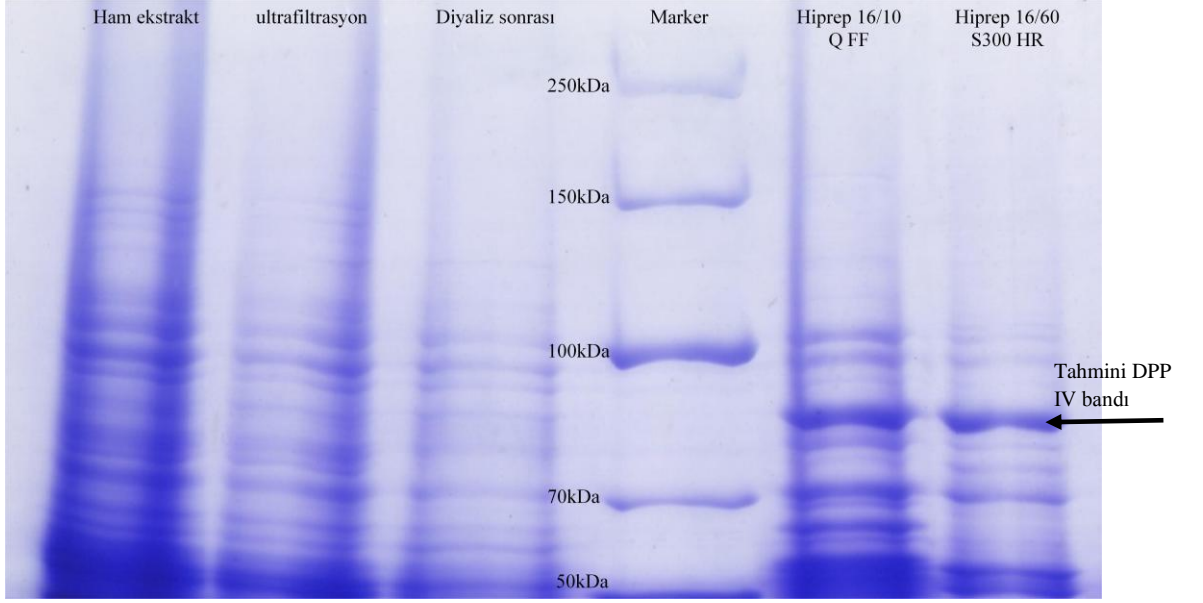
Tablo 4.11. Saflaştırma basamakları sonuçları

Saflaştırma basamakları	Toplam enzim aktivitesi (mU)	Toplam protein (mg)	Toplam hacim (mL)	Spesifik Aktivite (mU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham ekstrakt	34630,530	70,000	100	494,721	100	1,000
Ultrafiltrasyon %70	29794,996	57,150	75	521,347	86,040	1,053
Amonyum sülfat çöktürmesi	22619,874	25,672	31,5	881,093	65,320	1,780
Hiprep 16/10 Q FF	8593,930	3,270	5	2628,113	24,820	5,312
Hiprep 16/60 S300	2634,930	0,215	5	11151,154	6,920	22,540

Lactococcus lactis spp. *cremoris* suşu ile yapılan bir çalışmada sırasıyla jel filtrasyon kolonu olarak Sephadex G-75 kolonu ve iyon değiştirici kolon olarak karboksimetil selüloz kolon kullanılmış ve yapılan saflaştırma sonucunda verim %6 ve saflaştırma katsayısı 80 olarak belirtilmiştir (Guzman ve diğ. 2006). DEAE selüloz, arjinin sefaroz 4B afinite kolonu, Glycyl-prolyl-AH-sepharose 4B kolonu ve akrilamid jel filtrasyon kolonu kullanılan bir çalışmada verim % 9,2 ve saflaştırma katsayısı 148,4 olarak belirtilmiştir (Degraive ve Gros 2003).

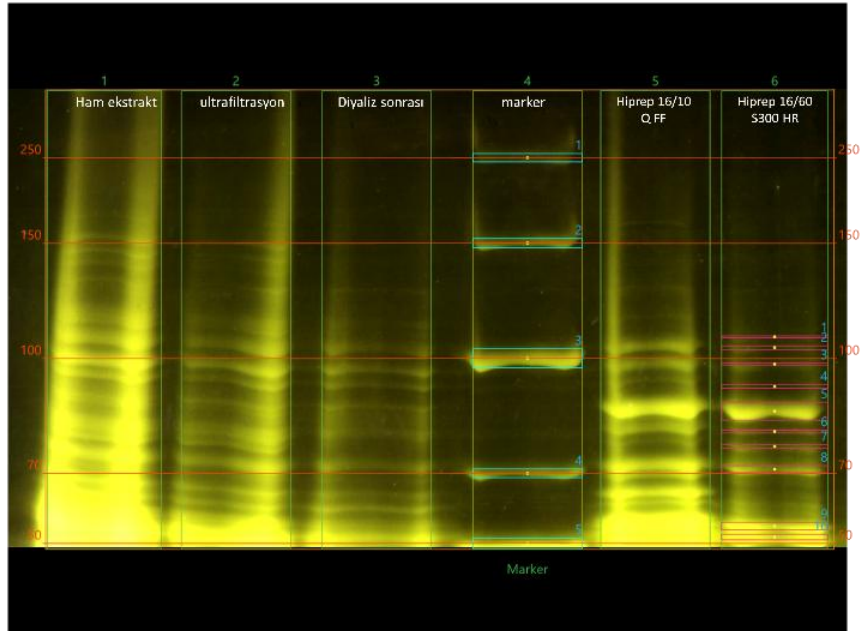
4.7 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)

DPP IV enziminin saflaştırma basamaklarının kontrolü içins saflaştırma tablosunda belirtilen basamaklardan örnekler alınmış ve SDS PAGE elektroforezine yüklenmiştir. Şekil 4.11'de örnek için %8'lik akrilamid jel üzerinde yürütülen protein bantlarının görüntüleri bulunmaktadır.

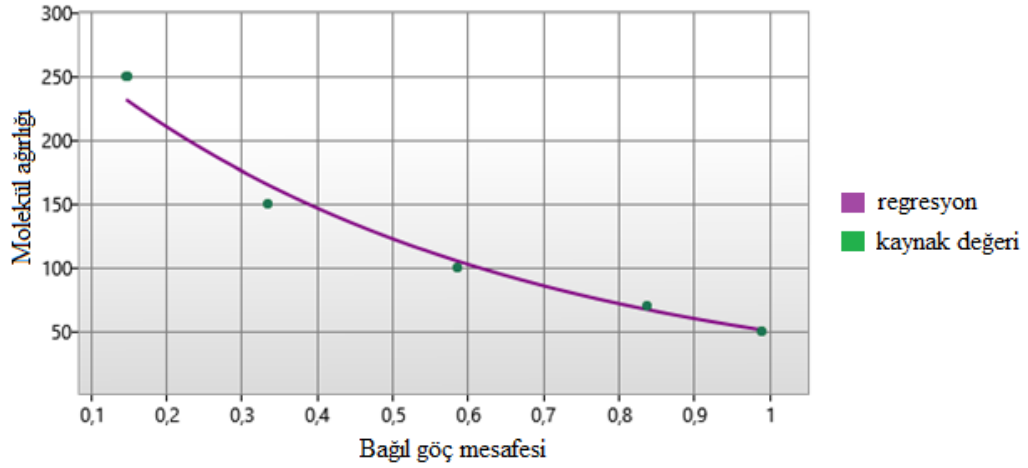


Şekil 4.11. Saflaştırma basamaklarına ait SDS Page jel elektroforezi görüntüsü

Yapılan saflaştırma işleminin kontrolünü sağlamak amacıyla yapılan SDS-PAGE analizi sonucuna göre saflaştırdığımız DPP IV enziminin molekül büyüklüğü kullandığımız programdaki hesaplamaya göre 84,64 kDa olarak bulunmuştur (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Thermo Scientific firmasının My Image Analysis (v2.0) yazılımı ile veri analizi



Şekil 4.13: Standart molekül büyüklüğü eğrisi (My Image Analysis(v2.0))

Tablo 4.12 Standart molekül büyüklüğüne eğrisine ait bilgiler

Regresyon metodu	Yarı logaritmik
Regresyon formülü	$Y = -0,79 * X + 2,48$
R^2 değeri	0,975612

Tablo 4.13 Sütun ve bantların analizi (Sütun 4 –Markerın molekül büyüklükleri)

Bant no	Hacim (İntensite)	Alan (Piksel)	Birim alandaki intensite	Ortanca intensite	Lokal hacim (intensite)	Birim alandaki lokal intensite	Bağıl göç mesafesi	Molekül ağırlığı (kDa)	Yüzde saflık	Yüzde saflık (sütun)
1	149864410	11622	12894,89	12593	40401927	3476,33	0,146	250	6,66	1,88
2	224155914	12797	17516,29	18761	76645470	5989,33	0,333	150	12,64	2,81
3	691053211	26462	26114,93	26728	285824386	10801,32	0,585	100	47,14	8,66
4	236569785	12154	19464,36	22616	41894697	3446,99	0,836	70	6,91	2,96
5	445984950	14587	30574,14	35209	161618834	11079,65	0,988	50	26,65	5,59

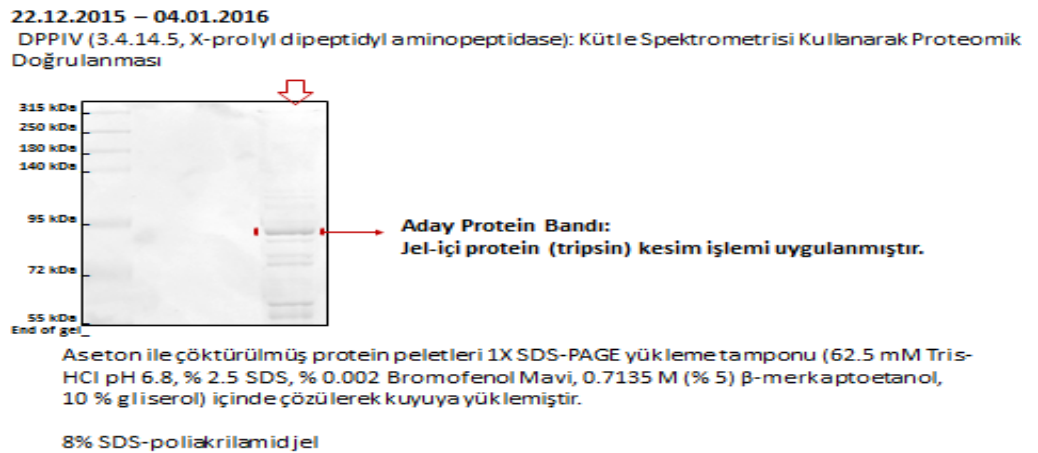
Tablo 4.14 Sütun ve bantların analizi (Sütun6–DPP IV olduğundan şüphelenilen bant)

Bant no	Hacim (İntensite)	Alan (Piksel)	Birim alandaki İntensite	Ortanca intensite	Lokal hacim (intensite)	Birim alandaki lokal intensite	Bağıl göç mesafesi	Molekül ağırlığı (kDa)	Yüzde saflık	Yüzde saflık (sütun)
1	37374482	2587	14447,04	12336	7954831	3074,93	0,537	113,56	1,35	0,41
2	46838250	5420	8641,74	13107	0	0	0,561	108,85	0	0,51
3	44762718	2654	16866,13	14649	10668254	4019,69	0,597	101,97	1,81	0,49
4	39186589	5163	7589,89	12336	0	0	0,646	93,34	0	0,43
5	702373290	24268	28942,37	29298	349732757	14411,27	0,7	84,63	59,29	7,65
6	77431787	3932	19692,72	16962	20050264	5099,25	0,744	78,11	3,4	0,84

Tablo 4.14 (devamı)

7	90666516	4550	19926,71	18247	21469715	4718,62	0,777	73,64	3,64	0,99
8	196747121	9594	20507,31	25957	29508491	3075,72	0,827	67,28	5	2,14
9	441083446	10574	41713,96	40092	101444804	9593,8	0,951	53,73	17,2	4,8
10	337399366	7584	44488,31	42662	49038123	6466	0,975	51,46	8,31	3,67

Şekil 4.12’de görülen SDS-PAGE görüntüsü yazılım tarafından Şekil 4.13’te elde edilen ‘Standart molekül büyüklüğü eğrisi’ ile karşılaştırılmış ve DPP IV olduğundan şüphelendiğimiz bantın molekül büyüklüğünü 84,63 kDa olarak vermiştir. Tablo 4.14’te ise ilgili DPP IV proteinimizin bulunduğu sütun üzerindeki bantların intensitesi ve kapladığı alan hesaba katılarak yapılan saflık analizinde ilgili bant için saflık değeri %59,29 olarak verilmiştir. KOMT enziminin inhibisyonu ve kinetiği üzerine kurgulanan ve 2009 yılında tamamlanan bir TÜBİTAK projesinde farmasötik amaçlı kullanılan domuz karaciğerinden izole edilmiş KOMT enziminin saflığı Sigma tarafından %30-60, araştırmacı tarafından ise aktif protein miktarı olarak %28 olarak verilmiştir (Bayraktar 2009, Degraeve ve diğ. 2003).DPP IV enzimi ile yaptıkları saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları ile bu kurguyu desteklemektedir. Bu nedenle yaklaşık %60’lık bir saflık kinetik çalışmaları gerçekleştirmek için yeterli bulunmuştur. Ancak elde edilen bantlar içinde tahminlediğimiz bantın DPP IV bantı olduğunu ispatlamamız gerekmektedir. Bu amaç için Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Proteomics Laboratuvarında (İstanbul) kütle spektrofotometrisi analizi yapılmış ve ilgili sonuçlar Şekil 4.14, 4.15 ve Tablo 4.15’te verilmiştir.



Şekil 4.14. DPP IV proteininin kütle spektrofotometrisi kullanarak proteomik doğrulanması

{MATRIX}
{SCIENCE} **MASCOT Search Results**

Protein View: gi|15384615

X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase [Lactococcus lactis]

Database: NCBI nr
 Score: 206
 Nominal mass (M_r): 87589
 Calculated pI: 5.46
 Taxonomy: Lactococcus lactis

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of gi|15384615 against nr.](#)

Search parameters

MS data file: DATA.TXT
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Variable modifications: Acetyl (N-term), Carbamidomethyl (C), Methylthio (C), Oxidation (C)

Protein sequence coverage: 1%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MRFNHFSIVD KNFDEQLAEL DQLGFRNSVF WDEKKILKDF LIQSPTDMTV
51 LQANTELDVI EFLKSSIELD WEIFWNIALQ LLDVFPNFDV EIGKATEFAK
101 KLNLPQRDVE MTTETIISAF YYLLCSRKRS GMILVEHWVS EGLLPLDNHY
151 HFFDNKSLAT FDSSLLEREV VWVESPVVTE QKGNKDLIKI QIIRPKSTEK
201 LPVVMTASPY HLGINEKAND LALHEMNVDL EKKDSHKIHV QGKLPQKRPS
251 ETKELPIVDK APYRPTHGWT YSLNDYFLTR GFASIYVAGV GTRGSNGFQT
301 SGDYQQIYSM TAVIDWLNGR TRAYTSRKKT HEIKATWANG KVANTGKSYL
351 GTMAYGAATT GVDGLEVILA EAGISSWYNY YRENGLVRSP GGFPGEDLDV
401 LAALTYSRNL DGADYLGNA EYEKRLAEMT TALDRKSGDY NQFWHNRNYL
451 INSDQVKADV LIVHGLQDWN VTPEQAYNFW QALPEGHAKH AFLHRGAHIY
501 MNSWQSIDFS ETINAYFSAK LLDRDLNINL PPVILQENSK EQWWSAVSKF
551 GGDDQLKLPL GKTAVSFAQF DNHYDDESFK KYSKDFNVFK KDLFENKANE
601 AVIDLELPSE LTINGPIELE IRLKLNDSKG LLSAQIIDFG PKRLEDKAR
651 VKDFKVLDRG RNFMLDDLVE LPLVESPYQL VTRGFTNLQN KDLITVSDLK
701 ADEWFTLKFE LQPTIYHLEK ADKLRVILYS TDFEHTVRDN RKVTYEIDLS
751 QSKLIPIES VKN
  
```

Unformatted sequence string: [763 residues](#) (for pasting into other applications).

Şekil 4.15: DPP IV enziminin protein dizilimi

Tablo 4.15 Kütle spektrofotometrisi analiz sonuçları özet tablosu

Sample ID:	PAU_1_RA6_01_739									
Database:	NCBI nr 20130423 (24,901,477 sequences; 8,584,108,097 residues)									
Taxonomy:	Mammalia (mammals) (66092 sequences)									
Type of search	MS/MS Ion Search									
Enzyme	Trypsin									
Variable modifications	Acetyl (N-term), Carbamidomethyl (C), Methylthio (C), Oxidation (M)									
Mass values	Monoisotopic									
Protein mass	Unrestricted									
Peptide mass tolerance	± 0.1 Da (# 13C = 1)									
Fragment mass tolerance	± 0.1 Da									
Max missed cleavages	2									
Instrument type	ESI-QUAD-TOF									
Number of queries	382									
	Protein ID:	Mass	Score	Matches	emPAI					
	X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase [Lactococcus lactis]	87589	206	9 (9)	0.04					
		Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Score	Expect	Rank	Peptide
		<u>79</u>	679.8789	1357.7432	1357.7605	-0.0173	72	0.0015	1	K.GLL SAQII DFGP K.K

Yapılan kütle spektrometri analizi sonuçlarına göre ilgili bant doğrulanmış ve jel filtrasyon kolonundan alınan fraksiyondaki DPP IV enziminin 87,589 kDa olduğu belirlenmiştir.

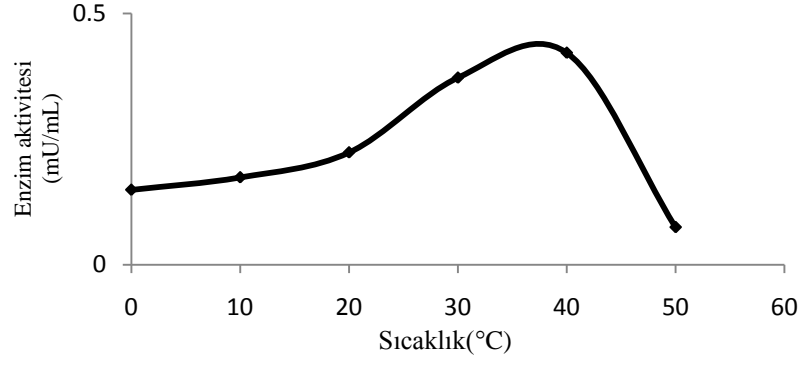
DPP IV enziminin molekül ağırlığı literatürdeki bilgilere dayanarak *Flavobacterium meningosepticum*, fare ve siçan için sırasıyla 80-87,5 ve 88 kDa olarak tespit edilmiş ayrıca *Streptococcus* suşlarından elde edilen enzimin molekül ağırlığı 80 kDa, *Lactobacillus helveticus* ve *Lactobacillus casei* spp. *casei*'den 72–87 kDa, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*'den 82 kDa, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*'den elde edilen dimer proteinlerin molekül ağırlığının 150-190 kDa, *Lactobacillus helveticus*'dan 140 kDa ve *Lactococcus lactis* spp. *lactis*'den elde edilen monomer proteinin molekül ağırlığının 65-90 kDa olduğu rapor edilmiştir (Kiefer-Partsch ve diğ. 1989, Zevaco ve diğ. 1990, Lloyd ve Pritchard 1991, Marguet ve diğ. 1992, Misumi ve diğ. 1992, Kabashima ve diğ. 1995, Sanz ve Toldra 2001, Degraive ve Gros 2003, Guzman ve diğ. 2006, Üstün ve Öngen 2012).

Yapılan çalışmalar dikkate alındığında çalışmamızda ulaşılan verim diğer çalışmalara yakın bir değerde olmasına rağmen saflaştırma katsayısı diğer çalışmalara göre düşük bulunmuştur. Ancak DPP IV enziminin saflığı enzim karakterizasyonu yapabilmek için yeterli bulunmuştur.

4.8 Enzim karakterizasyonu

4.8.1 Optimum çalışma sıcaklığın belirlenmesi

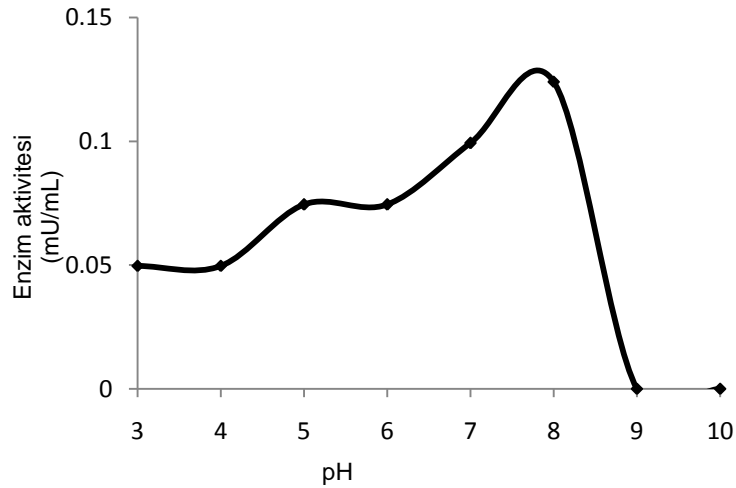
Lactococcus lactis spp. *lactis*'den saflaştırılan DPP IV enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için yapılan analizlerin sonucunda optimum sıcaklık değeri 40°C bulunmuştur (Şekil 4.16). *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* ile yapılan bir çalışmada optimum sıcaklık 45°C olarak belirtilmiştir (Guzman ve diğ. 2006). *Lactobacillus helveticus* ile yapılan bir çalışmada ise optimum sıcaklık 40°C olarak belirtilmiştir (Degraive ve Gros, 2003). Yapılan literatür çalışmaları çalışmamızda aldığımız sonuçlara yakın bulunmuştur. Gözlemlenen farklılıkların saflaştırılan enzimlerin kaynaklarından olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.16: *Lactococcus lactis* spp. *lactis*'den saflaştırılan DPP IV enzimi aktivitesi-sıcaklık grafiği

4.8.2 Optimum çalışma pH belirlenmesi

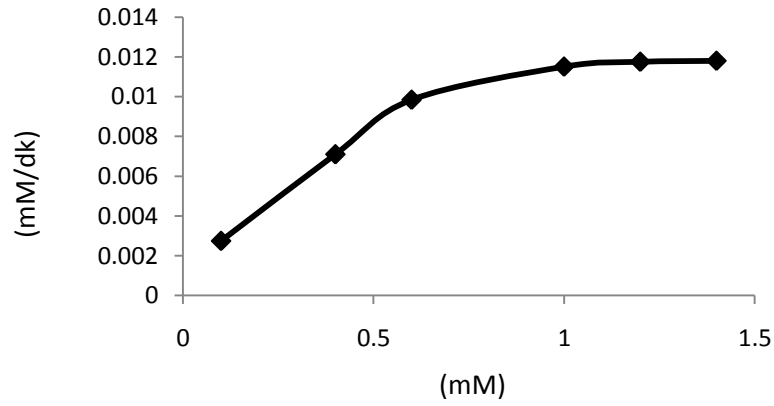
Lactococcus lactis spp. *lactis*'den saflaştırılan DPP IV enziminin optimum pH'nın belirlenmesi için yapılan analizlerin sonucunda optimum pH değerinin 8 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17). *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* ve *Lactobacillus helveticus* ile yapılan çalışmalarda optimum pH 7 olarak belirtilmiştir (Degraive ve Gros 2003, Guzman ve diğ. 2006)). Aldığımız sonuçlar diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında bulunan değerlerin yakın olduğu gözlemlenmiştir.



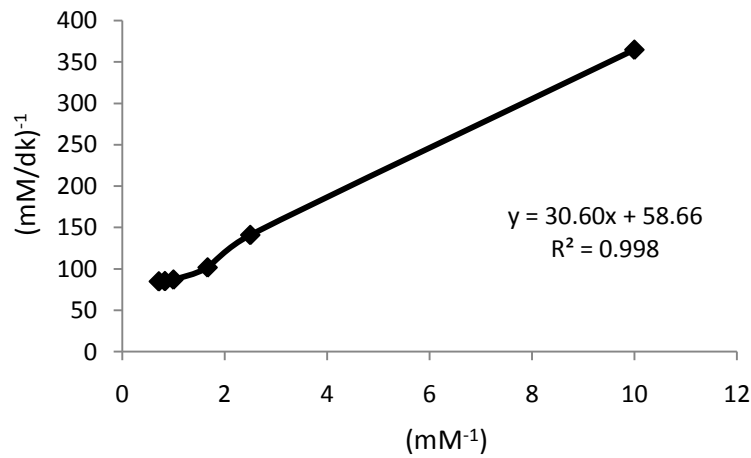
Şekil 4.17: *Lactococcus lactis* spp. *lactis*'den saflaştırılan DPP IV enzimi aktivitesi-pH grafiği

4.8.3 Enzim substrat spesifikliği

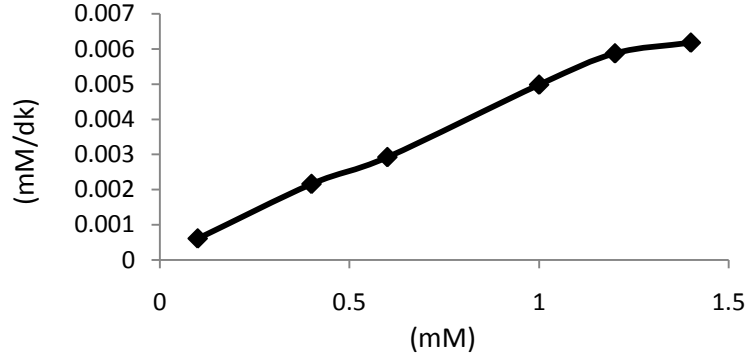
Enzimin substrat spesifikliği belirlenirken Gly-Pro-pNA ve Ala-Pro-pNA substratları kullanılmış ve Gly-Pro-pNA peptit dizisine ait K_m değeri 0,57 ve V_{max} değeri 0,017 bulunmuştur. Ala-Pro-pNA substratına ait K_m değeri 2,90 ve V_{max} değeri 0,018 olarak hesaplanmıştır. Sonular dikkate alındığında DPP IV enziminin Gly-Pro-pNA substratına daha ilgili olduğu grlmştr.(şekil 4.18-4.21) Yapılan literatr alışmalarında Ala-Pro-pNA peptit dizisinin Gly-Pro-pNA'e göre relatif aktivitesinin daha yüksek olduğu grlmştr(Degraive ve Gros 2003, Sanz ve Toldra 2001).



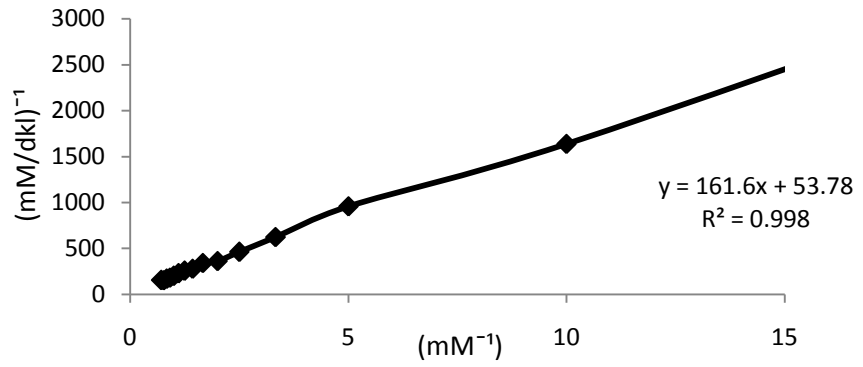
şekil 4.18: Gly-Pro-pNA substratına ait Michaelis –Menten grafiği



şekil 4.19: Gly-Pro-pNA substratına ait Lineweaver-Burk grafiği



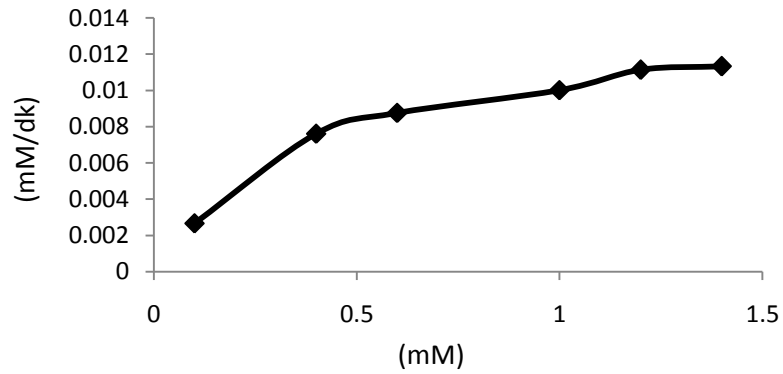
Şekil 4.20: Ala-Pro-pNA substratına ait Michaelis-Menten grafiği



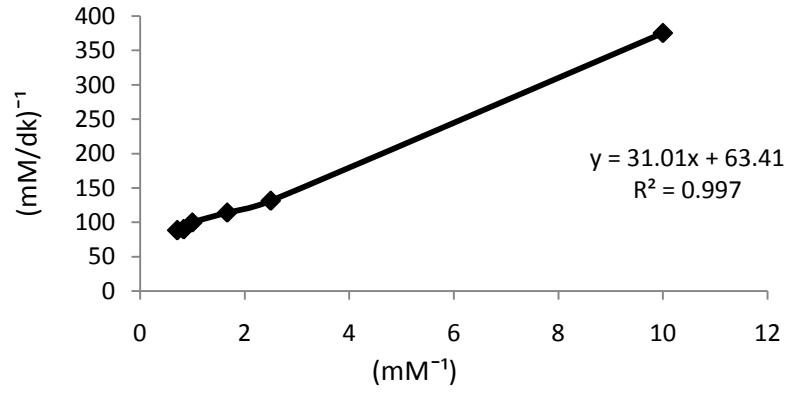
Şekil 4.21: Ala-Pro-pNA substratına ait Lineweaver-Burk grafiği

4.8.4 Enzim inhibisyonları

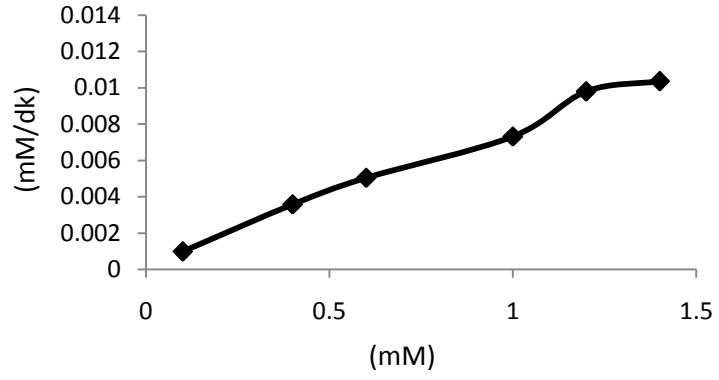
Yapılan analizlerden alınan K_m , V_{max} , inhibisyon türü ve relatif aktivite sonuçları Tablo 4.14'de belirtilmiştir ve alınan sonuçlara ait Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.22 - 4.41).



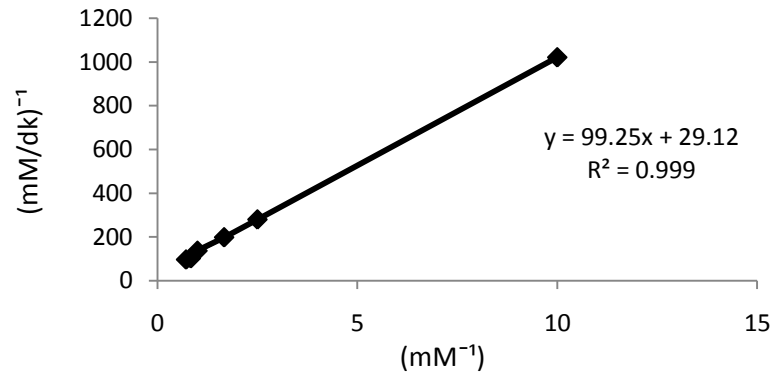
Şekil 4.22: Gly- Pro-Phe inhibitörüne ait Michaelis-Menten grafiği



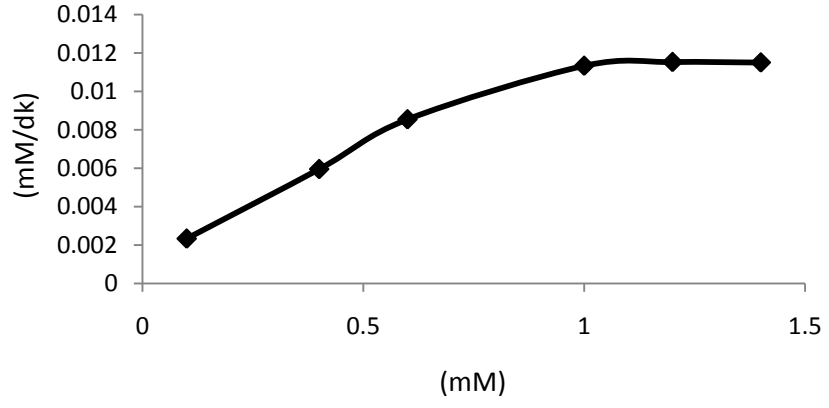
Şekil 4.23: Gly- Pro-Phe inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği



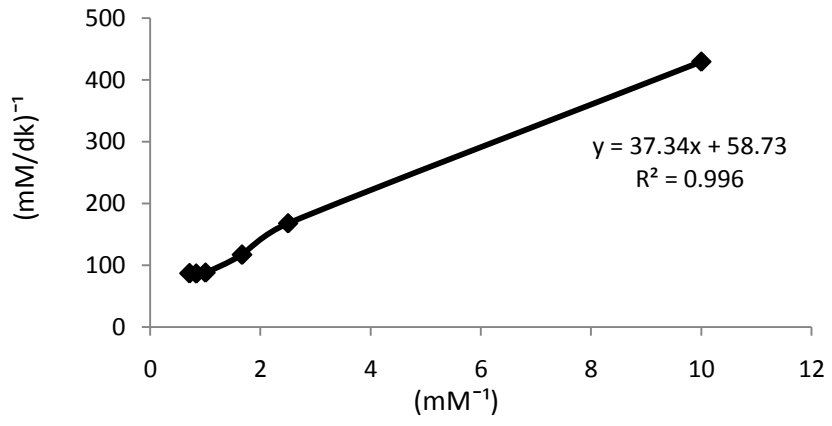
Şekil 4.24: Gly- Pro-Ile inhibitörüne ait Michaelis-Menten grafiği



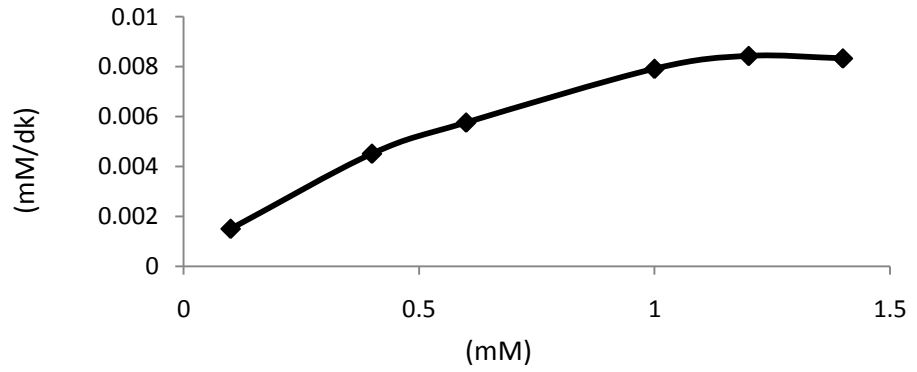
Şekil 4.25: Gly- Pro-Ile inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği



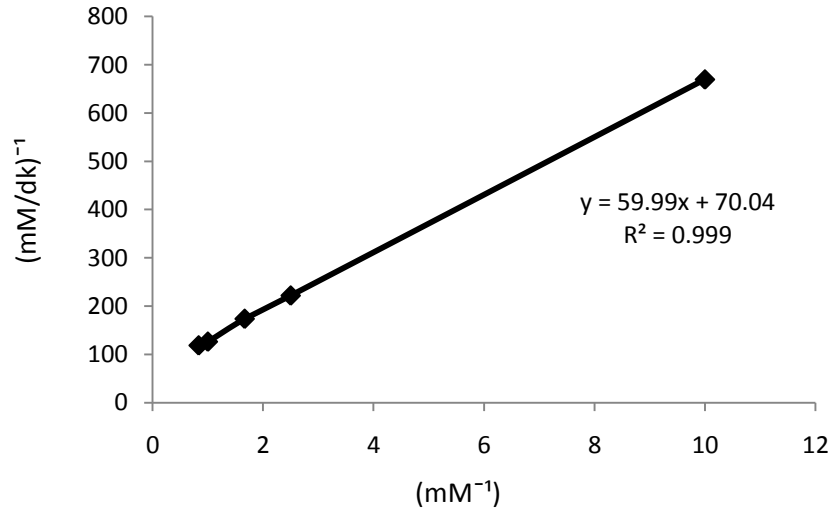
Şekil 4.26: Phe-Val-Val-Asn-Ala inhibitörüne ait Michaelis - Menten grafiği



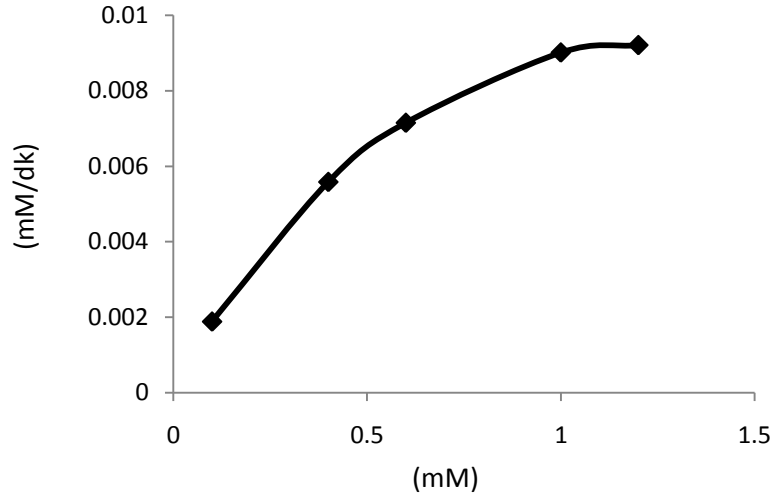
Şekil 4.27: Phe-Val-Val-Asn-Ala inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği



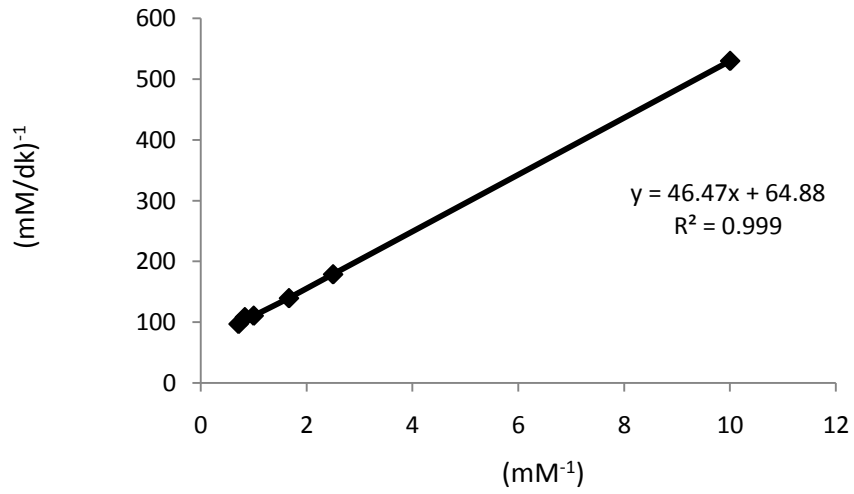
Şekil 4.28: PMSF inhibitörüne ait Michaelis - Menten grafiği



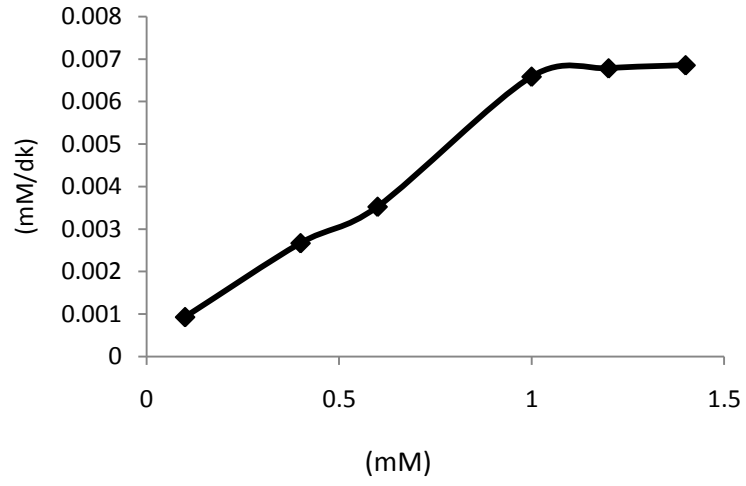
Şekil 4.29: PMSF inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği



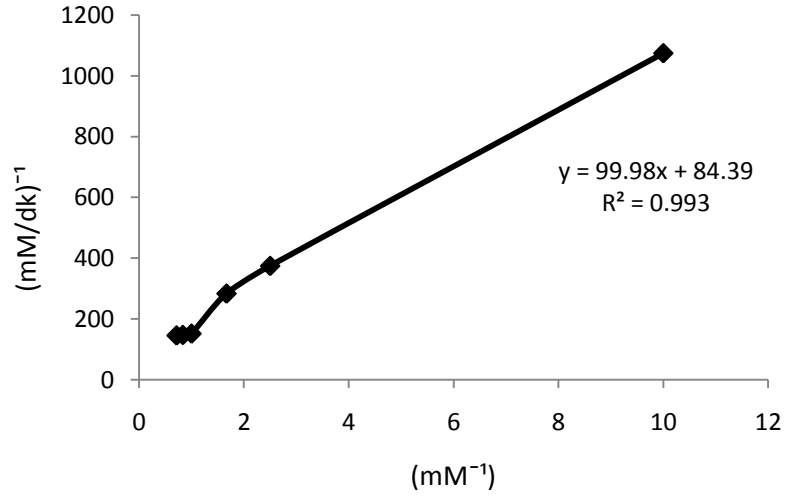
Şekil 4.30: EDTA inhibitörüne ait Michaelis Menten grafiği



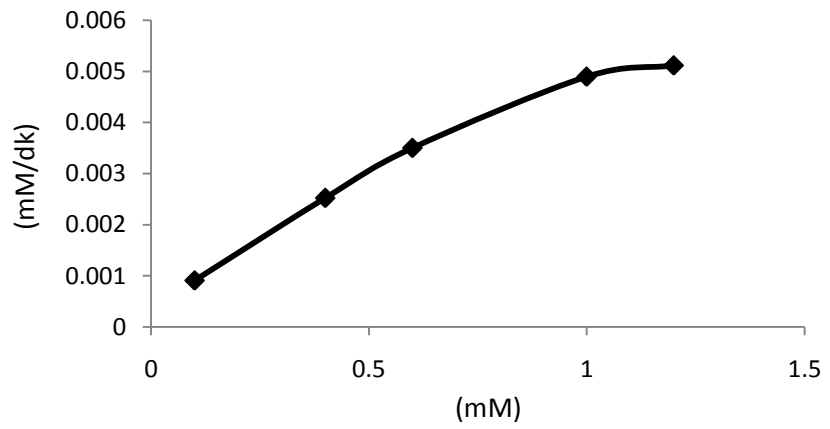
Şekil 4.31: EDTA inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği



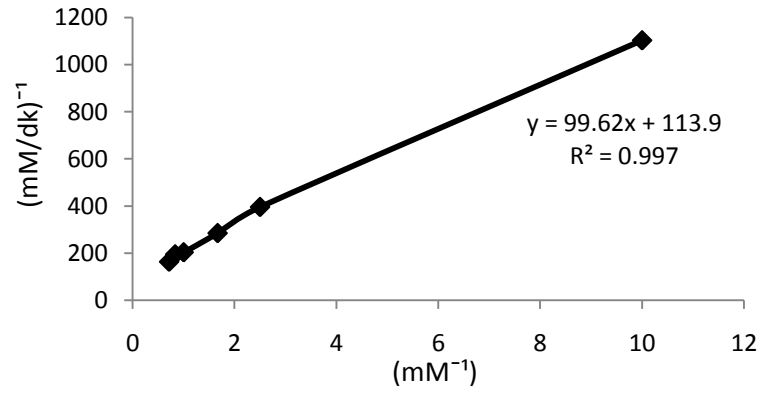
Şekil 4.32: Ca inhibitörüne ait Michaelis - Menten grafiği



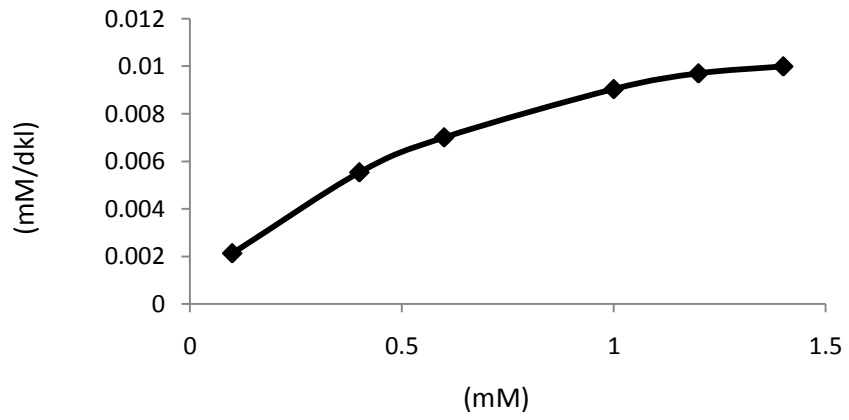
Şekil 4.33:Ca inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği



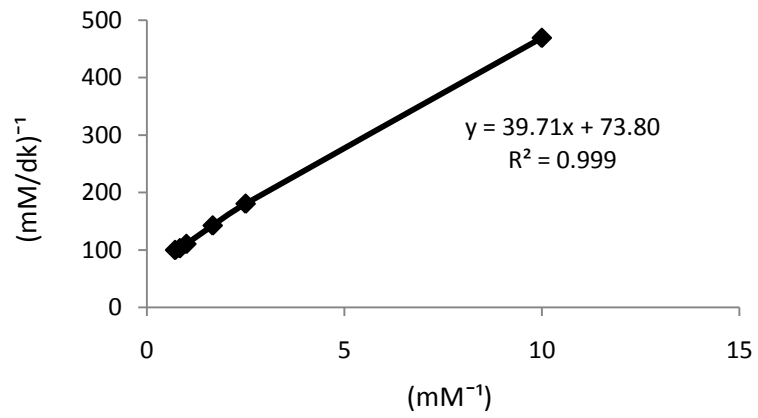
Şekil 4.34: Hg inhibitörüne ait Michaelis Menten grafiği



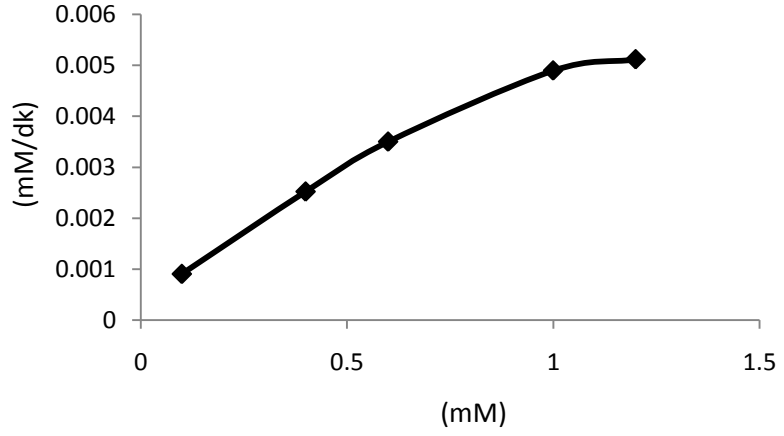
Şekil 4.35: Hg inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği



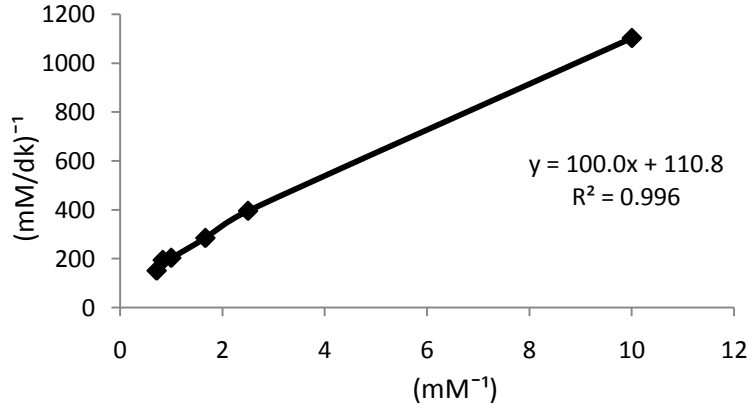
Şekil 4.36: Fe inhibitörüne ait Michaelis Menten grafiği



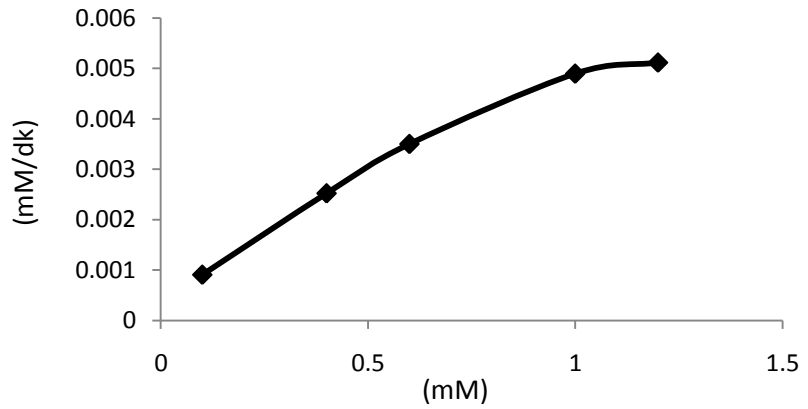
Şekil 4.37: Fe inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği



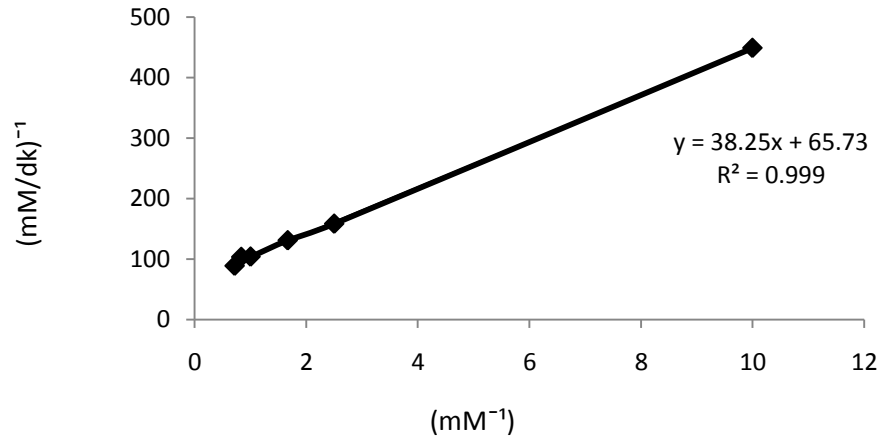
Şekil 4.38: Zn inhibitörüne ait Michaelis Menten grafiği



Şekil 4.39: Zn inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.10: Mg inhibitörüne ait Michaelis Menten grafiği



Şekil 4.41:Mg inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği

Yapılan çalışmada inhibisyon için kullanılan inhibitör maddeler arasında en yüksek inhibisyon etkisini gösteren iyonların Ca^{+2} , Hg^{+2} ve Zn^{+2} olduğu tespit edilmiştir. Serin peptidaz enzimlerin aktif bölgesindeki serin amino asitini bloke ederek inhibitör etki gösteren PMSF'nin DPP IV enzimi üzerinde inhibitör etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Enzimin aktif bölgesinde bulunan metal iyonuna bağlanarak inhibitör etkiye sebep olan EDTA'nın saflaştırılan enzim üzerinde inhibitör etki gösterdiği görülmüştür. Enzimin aktif bölgesinde metal iyonu bulunması enzimin metaloprotein olduğunu göstermektedir (Janecki ve Reilly 2005). Substrat olarak kullanılacak morfinlerin hidrolizi sonucunda ortaya çıkan peptit dizilerinin enzim üzerinde düşük oranlarda inhibitör etki gösterdiği görülmüştür. Yapılan bir çalışmada DPP IV enzimi üzerine en yüksek inhibitör etkiyi Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının gösterdiği görülmüştür (Sanz ve Toldra 2001). DPP IV enzime ait 0,1 mM konsantrasyonda Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonun enzimi yakın değerlerde inhibe ettiği ve bu iyonları Fe^{+2} iyonunun izlediği belirtilmiştir. Aynı çalışmada PMSF ve EDTA birbiri ile kıyaslanmış ve 0,1mM konsantrasyonda PMSF'nin daha etkili bir inhibitör olduğu belirlenmiştir (Degraive ve Gros 2003). *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* suşunun kullanıldığı EDTA ve PMSF ile yapılan bir çalışmada alınan sonuçlara bakıldığında PMSF'in inhibitör etki gösterdiği ancak EDTA'nın inhibitör etki göstermediği görülmüştür (Guzman ve diğ. 2006) Yapılan literatür çalışmalarının sonuçlarına bakıldığında alınan sonuçlardaki farklılıkların enzimin kaynağı olan mikroorganizmanın farklı olması ve kullanılan analiz metotlarının farklılığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. İnhibitör sonuçlarını değerlendirmek

için kullanılan kontrol sonuçları Gly-Pro-pNA substratına ait sonuçlardır. Yapılan analizler sonucunda K_m , V_{max} , relatif aktivite değerleri hesaplanmış ve inhibisyon türü Tablo 4.16’da gösterilmiştir.

Tablo 4.16 İnhibitörlere ait K_m , V_{max} değerleri ve inhibisyon türü bilgileri

İnhibitör	V_{max} (mM/dk)	K_m (mM)	İnhibisyon Türü	Relatif Aktivite
Gly-Pro-Phe	0,015	0,48	Yarışmayan	%97,24
Gly-Pro-Ile	0,034	3,4	Yarışmalı	%88,96
Phe-Val-Val-				
Asn-Ala	0,017	0,63	Yarışmalı	%98,84
PMSF	0,014	0,85	Yarışmalı	%71,50
Ca ⁺²	0,0118	1,184	Yarışmalı	%58,89
Hg ⁺²	0,008	0,874	Yarışmalı	%52,36
Fe ⁺²	0,0135	0,53	Yarışmasız	%85,81
Zn ⁺²	0,009	0,9	Yarışmalı	%56,57
Mg ⁺²	0,015	0,581	Yarışmasız	%96,74
EDTA	0,15	0,71	Yarışmalı	%88,12

4.9 Ticari Enzim Denemeleri

Piyasada satışta olan ticari enzimlere çalışmamızda uyguladığımız enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Alınan sonuçlar Tablo 4.17’de görülmektedir.

Tablo 4.17 Ticari enzim örnekleri, toplam enzim aktivitesi değerleri

Enzim örnekleri	Enzim aktivitesi (mU/mL)
Enzymatic therapy/Gluten defense	19,186
Now foods/Gluten digest	12,798
Swanson health products/BioCore DPP IV	14,502
Country life/Gluten-zyme	0,378
Enzymedica Inc./ GlutenEase	18,57
Emerald lab./ Digestive health	0,733
BrainChild Nutritionals/Basic support prob.	1,230
Elite science/Digestive Enzymes Ultra chewable	35,344
Klaire labs./ Vital-zymes chewable	36,787

Sonuçlara bakıldığında enzim aktivitesi en yüksek olan ticari enzim Klair labs firmasına ait olan Vital-zymes chewable'dır. Yapılan çalışmanın sonucunda jel filtrasyon kolonundan elde edilen toplam enzim aktivite değeri 526,986 mU/mL olarak bulunmuştur. Piyasada satılan enzimlerle karşılaştırıldığında saflaştırdığımız enzimin aktivitesinin ticari enzimler içindeki en yüksek aktivite gösteren örneğin enzim aktivitesi değerinin 14,32 katı olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada kullanılacak inokülasyon oranının belirlenmesi için *Lactococcus lactis spp. lactis* suşunun inokülasyon oranları (%1, %2, %5 ve %10) denenmiştir. Alınan sonuçlara göre %5'lik *Lactococcus lactis spp. lactis* inokülasyon denemesi sonuçları %1 ve %2'lik inokülasyon sonuçlarına göre daha yüksek spesifik büyüme hızı ($0,607h^{-1}$, 4. saatte) vermiştir. Kullanılan suşun durağan faza geçme süresi 6 saattir ve bu süre sonunda ulaşılan hücre sayısı $11,5 \times 10^7$ kob/mL'dir.

Hücre içi bir enzim olan DPP IV enziminin hücreden geri kazanılması için hücre membranının parçalanması gerekmektedir. Bu nedenle hücrenin parçalanması için sonikatör kullanılmıştır. Sonikatör ile hücre parçalama için Design Expert programı kullanılmış ve BBD dizaynı uygulanmıştır. Tasarımı yapılan deney sonucunda parçalama için elde edilen optimum parametre değerleri; süre 28 dk, güç %91 ve döngü 3 olarak belirlenmiştir.

DPP IV enziminin saflaştırılması için uygulanan kolon kromatografisinden öncesinde enzimin konsantrasyonunun artırılması için amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Çöktürme işleminde kullanılacak amonyum sülfat tuzunun denemeleri yapılmış ve alınan sonuçlara göre tuz oranı %70 olarak belirlenmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesinden sonraki adım diyalizdir. Bu adımda konsantrasyonu sağlanan enzimler kolon kromatografisi için hazırlanmıştır.

Yaptığımız saflaştırma işlemlerinde sırasıyla Hiprep 16/10 Q FF Sepharose kolon ve Hiprep 16/60 S300 HR Sephacryl kolon kullanılmıştır. İyon değiştirici kolondan çıkan fraksiyonun spesifik aktivite $2628,113 \text{ mU/mg}$, verim %24,81 ve saflaştırma katsayısı 5,3 olarak bulunmuştur. Bu kolondan çıkan fraksiyon jel filtrasyon kolonuna yüklenmiş ve saflaştırma sonucunda spesifik aktivite $11151,154 \text{ mU/mg}$, verim %6,9 ve saflaştırma katsayısı 22,54 olarak bulunmuştur.

Yapılan saflaştırma işleminin kontrolünü sağlamak amacıyla yapılan SDS Page analizi sonucu My Image Analysis (v 2.0) programına yüklenmiştir ve alınan sonuçlara göre saflaştırdığımız DPP IV enziminin molekül büyüklüğünün 84,63 kDa olduğu ve saflığın %59,29 olduğu görülmüştür. Molekül büyüklüğünün kontrol

edilmesi ve bu saflığa sahip olan bantın DPP IV olduğunun kanıtlanabilmesi için kütle spektrometri doğrulaması yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre ilgili bantın molekül büyüklüğünün 87,589 k Da olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar enzimin karakterizasyon çalışmalarının yapılabilmesi için yeterlidir.

Enzim karakterizasyonu çalışmalarında optimum sıcaklığın 40°C ve optimum pH'ın 8 olduğu belirlenmiştir. Gly-Pro-pNA peptit dizisine ait K_m değerinin Ala-Pro-pNA peptit dizisine ait K_m değerinden düşük olduğu tespit edilmiştir. Analizler sonucunda 1 mM konsantrasyonda DPP IV enziminin inhibisyonunda en yüksek etkiye sahip metal iyonlarının Hg^{+2} , Ca^{+2} ve Zn^{+2} olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan peptit dizilerinin enzimi düşük oranda etkilediği belirlenmiştir. Serin peptidazlar üzerinde inhibitör etkisi olduğu bilinen PMSF'nin ve metal iyonlarına bağlanarak inhibitör etki gösteren EDTA'nın DPP IV enzimi üzerine inhibitör etkisi olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada saflaştırılan DPP IV enzimi ticari enzimlerle enzim aktivitesi göz önüne alınarak kıyaslanmıştır. Alınan sonuçlara göre saflaştırılan DPP IV aktivitesi ticari enzimin aktivitesinin 14,32 katı olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında *Lactococcus lactis* spp. *lactis* suşundan elde edip saflaştırılan enzimin enzim aktivitesi açısından pazardaki benzer ürünler ile rekabet edebilecek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Ürünün gıda takviyesi olarak kullanılabilmesi için gıda morfinleri-DPP IV enzimi etkileşimlerinin ortaya konması ve maliyet analizinin yapılması ayrıca bu etkileşimlerin yalnızca *in vitro* koşullarda değil aynı zamanda *in vivo* koşullarda da analiz edilmesi gerekmektedir. Saflaştırma işleminin sonuçlarına bakıldığında elde edilen saflaştırma katsayıları literatürdeki bazı değerlerden düşük bulunmuştur. Saflaştırma işleminde kullanılan kolonlara ek olarak afinite kolonları, hidrofobik etkileşim kolonları gibi kolonların eklenmesi ile ilgili saflaştırma katsayısı arttırılabilir böylece elde edilen %59,29 saflık arttırılarak sağlık sektöründe ya da marker olarak kullanım alanı bulabilir.

6. KAYNAKLAR

- Akçelik, M., ve Şanlıbaba, P., Laktokoklarda Kazein Metabolizması, *Gıda*, 25.5 (2000).
- Bayraktar , O., Kateşol-O-Metiltransferaz (KOMT) Enzim Aktivitesinin Bitkilerden Elde Edilen Bazı Alkaloitler ve Fenollerle Engellenmesi, İzmir, (2009).
- Bockelmann, W., Fobker, M., and Teuber M., Purification and Characterization of The X-Prolyl-Dipeptidyl-Aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*, *Int J Dairy Technol*, 51-66, (1991).
- Brandt I., Lambeir A. M., Maes M. B., Scharpé S., and Meester I. D., Peptide Substrates of Dipeptidyl Peptidases, Dipeptidyl Aminopeptidases, Basic Science and Clinical Applications, *Adv Exp Med Biol*, 575, 1, 3-18, (2006).
- Brudnak, M., Buchholz, I., Hoener, S., Newman, L and Pangborn, J., Guide to intestinal health in autism spectrum disorder, a comprehensive review of intestinal health issues in autism spectrum disorders and the options available for treating them, Authored By Kirkman Labs' Technical Staff, 1–175, (2005).
- Copeland, R. A., Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis, John Wiley & Sons, Pennsylvania, (2004).
- Çetin, E., M., Üstün, Ö., Kırılmaz, L. G., “The Application of Hydroxy propyl methyl cellulose Phtalate Capsules: an Alternative Administration Route of Dipeptidyl Peptidase Enzyme”, *Pharmaceutical Sciences World Congress*, Amsterdam - The Netherlands, (2007).
- Dawson R. M. C., Elliott D.C., Elliott W. H., and Jones K. M., *Data for Biochemical Research*, London, (1969).
- Degraeve P.,and Martial-Gros A., Purification and Partial Characterisation Of X-Prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase of *Lactobacillus helveticus* ITG LH1, *Int J Dairy Technol*, 13,7, 497-507, (2003).
- Duke-Cohan, Jonathan S., et al. "A novel form of dipeptidylpeptidase IV found in human serum. Isolation, characterization, and comparison with T lymphocyte membrane dipeptidylpeptidase IV (CD26)," *J. Biol. Chem*, 270, 23, 14107-14114, (1995).
- Durinx, C., Lambeir, A.M., Bosmans, E., Falmagne, J.B., Berghmans, R., Haemers, A., Scharpe, S., and De Meester, I., Molecular Characterization of Dipeptidyl Peptidase Activity in Serum Soluble CD26/Dipeptidyl Peptidase IV is Responsible for the Release of X-Pro Dipeptides, *Eur J Biochem*, 267, 5608-5613, (2000).

Gökalp, Y. H., Nas, S., Certel, M., *Biyokimya-1 "Temel yapılar ve kavramlar*, 3. baskı, Denizli, (2002).

Hopsu-Havu V. K., and Glenner G.G., Histochemical Demonstration of A Trypsin-Like Esterase Activity in Mast Cells, *Histochimie*, 7,197–201, (1966).

Harrigan W. F., *Laboratory methods in food microbiology*, Gulf Professional Publishing, California, (1998).

Janecki D. J., and Reilly J. P., Denaturation of metalloproteins with EDTA to facilitate enzymatic digestion and mass fingerprinting, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 19(10), 1268-1272, (2005).

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., & Shakhova, V., Comparative genomics of the lactic acid bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(42), 15611-15616, (2006).

Kabashima T., Yoshida, T., Ito, K., and Yoshimoto,T., Cloning, Sequencing, and Expression of The Dipeptidyl Peptidase IV Gene from *Flavobacterium meningosepticum* in *Escherichia coli*, *Arch Biochem Biophys*, 320,123–128, (1995).

Kabanova N., Kazarjan A., Stulova I., andVilu R., Microcalorimetric Study of Growth of *Lactococcus lactis* IL1403 at Different Glucose Concentrations in Broth, *Thermochim Acta* 496,1, 87-92, (2009).

Kınık, Ö., Gürsoy, O.,Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptitler, *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(2), 195-203,(2002).

Kıran, E. Ö.,Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N., , Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, *KSÜ. Fen ve MühendislikDergisi*, Kahramanmaraş, 9 12-19,(2006).

Kiefer-Partsch, B., Bockelmann W., Geis A., Teuber M., Purification of An X-Prolyl-Dipeptidyl Aminopeptidase from The Cell Wall Proteolytic System of *Lactococcus Lactis* Subsp. *Cremoris*, *Appl Microbiol Biot*, 31, 1, 57–78, (1989).

Kikkawa, Fumitaka, et al. Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1751.1, 45-51, (2005).

Kiper, M., Biyoteknoloji sektörel inovasyon sistem-kavramlar dünyadan örnekler Türkiye’de durum ve çıkarımlar, Türkiye teknoloji geliştirme vakfı, 1. baskı, (2013).

Koç, B., and Kaymak-Ertekin, F., Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları, *Gıda*, 35, 1, (2010).

Lloyd R. J.,and Pritchard G. G., Characterization of X-prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *J Gen Microbiol*, 137,1, 49-55, (1991).

Marguet D., Bernard A. M., Vivier I., Darmoul D., Naquet P., and Pierres M., Cdna Cloning for Mouse Thymocyte-Activating Molecule, A Multifunctional Ecto-Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) Included in A Subgroup of Serine Proteases, *J Biol Chem*, 267, 4, 2200-2208, (1992).

Marchetti. B., Scifo, R., Batticane, N., Scapagnini, U., Immunological significance of opioid peptide dysfunction in infantile autism, *Brain Dysfunction*, 3, 346-354, (1990).

Misumi Y., Hayashi Y., Arakawa F., and Ikehara Y., Molecular Cloning and Sequence Analysis of Insan Dipeptidyl Peptidase IV, A Serine Proteinase on The Cell Surface, *Biochim Biophys Acta*, 1131, 333–336, (1992).

Panesar P.S., Kennedy J.F., Gandhi D.N., and Bunko K., Bioutilisation of Whey for Lactic Acid Production, *Food Chem*, 105,1-14, (2007).

Perez Guzman, E. A., Victoria T. C., Cruz-Camarillo R., and Hernandez-Sanchez H., Improvement of Fermentation Conditions for the Production of X-Prolyl-Dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis*, *World J Microb Biot*, 20, 413-417, (2004).

Saboya L. V., Maillard M-B., and Lortal S., Efficient mechanical disruption of *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* and *Propionibacterium freudenreichii* by a new high-pressure homogenizer and recovery of intracellular aminotransferase activity, *J Ind Microbiol Biot*, 30, 1, 1-5, (2003).

Sanz Y., and Toldra F., Purification and Characterization of an X-Prolyl-Dipeptidyl Peptidase from *lactobacillus sakei*, *Appl Env Microb*, 67,1815-1820, (2001).

Senten K., Van der Veken P., Bal G., De Meester I., Lambeir A. M., Scharpé S., Development of Potent and Selective Dipeptidyl Peptidase II Inhibitors, *Bioorg Med Chem Lett*, 12, 20, 2825–2828, (2002).

Sentandreu M. A., and Toldra F., Dipeptidyl Peptidase IV from Porcine Skeletal Muscle: Purification and Biochemical Properties, *Food Chem*, 75, 2, 159–168, (2001).

Tunail N., *Mikrobiyoloji*, Palme yayıncılık, Ankara, (2009).

Üstün Ö., Öngen G., Production and Separation of Dipeptidyl Peptidase IV from *Lactococcus lactis*: Scale Up for Industrial Production, *Bioproc Biosyst Eng*, 35, 8,1417-1427, (2012).

Üstün-Aytekin, Ö., Arısoy, S., Aytekin, A. Ö., & Yıldız, E., Statistical optimization of cell disruption techniques for releasing intracellular X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Ultrason Sonochem*, 29, 163-171,(2016).

Wiseman, A. (ed.) *Handbook of Enzyme Biotechnology*, (2nd ed.) Ellis Horwood Ltd., UK(1987).

Yılmaz, A., Oral antidiyabetikler (OAD), Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Erzurum (2014).

Zevaco C., Monnet V., Gripon J. C., Intracellular X-Prolyl Dipeptidyl Peptidase From *Lactococcus Lactis* Spp. *Lactis*: Purification and Properties, *J Appl Microbiol*, 68, 4, 357–366, (1990).

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sevda ARISOY

Doğum Yeri ve Tarihi : Erbaa- 19.07.1988

Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi

Elektronik posta : sevdarisoy@hotmail.com

İletişim Adresi : Mehmetçik mah. 1308 sok. No:29
Kınıklı-Denizli

Yayın Listesi :

Üstün-Aytekin, Ö., Arısoy, S., Aytekin, A. Ö., & Yıldız, E. (2016). Statistical optimization of cell disruption techniques for releasing intracellular X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 163-171.

Arısoy, S., Aytekin, Ö., (2014). Disruption of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* to release intracellular dipeptidyl peptidase IV: determining of sonication parameters by response surface methodology, ISNFF 2014 7th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods, 14-17 October, Istanbul.

Arısoy, S., Şeker, A., Aytekin, Ö., (2015). Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitor Activity From Casein Generated By *Lactobacillus Kefiri*. 2nd International Conference on Food and Biosystems Engineering, 28-31 May, Mykonos Island, Greece.

Arısoy, S., Ateş, N., Işık, A., Demiray, E., Aytekin, Ö., (2015). Konveksiyonel Kurutmanın *Spirulina platensis*'in Protein ve Antioksidan Miktarı Üzerine Etkisi, Kurutulmuş ve Yarı Kurutulmuş Gıdalar Sempozyumu, 13-15 Mayıs, Denizli.