

ÇİĞDEM (*CROCUS BIFLORUS*) YUMRULARINDAN PROTEAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE SAFLAŞTIRILAN ENZİMİN KAZEİNİN KOAGÜLASYONUNDA KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Safinur Yıldırım Çelik*

Bayburt Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Sınıf Eğitimi Bölümü, Bayburt, Türkiye

Geliş / Received: 10.10.2017; Kabul / Accepted: 03.01.2018; Online baskı / Published online: 20.02.2018

Yıldırım Çelik, S. (2018). Çiğdem (*Crocus biflorus*) yumrularından proteaz enziminin saflaştırılması ve saflaştırılan enzimin kazeinin koagülasyonunda kullanılabilirliğinin araştırılması. *GIDA* (2018) 43 (2): 231-239 doi: 10.15237/gida.GD17095

ÖZ

Son yıllarda, hayvanlardan insanlara geçen bazı hastalıklarda (SARS, deli dana, domuz ve kuş gribi) artış olduğu bilinmektedir. Tüketicilerde, hayvansal proteazların gıda maddesi yapımında kullanımı bu hastalıkların kendilerine bulaşacağına dair endişelere yol açmaktadır. Bu nedenlerden dolayı bitkisel kaynaklı ürünlere bir talep artışı olmuştur. Ticari olarak satılan enzimlerin ise sadece az bir kısmının bitkisel kaynaklı olması, araştırmacıları ticari olarak da kullanılabilecek yeni bitkisel proteaz kaynakları aramaya sevk etmiştir. Bu çalışmada, ilk kez çiğdem (*Crocus biflorus*) yumrularından proteaz enzimi saflaştırılmış ve bazı karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Enzim, amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile 86 kat saflaştırılmıştır. Proteaz enziminin optimum pH'sı 5.5 ve optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur. V_{max} ve K_M değerleri ise sırasıyla 47 mg/L.dak ve 0.9 g/L olarak hesaplanmıştır. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 35 kDa olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılan enzimin, peynir yapımının ilk basamağı olan kazeinin koagülasyonu işlemlerinde kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Çiğdem (*Crocus biflorus*), proteaz, koagülasyon, kazein

PURIFICATION OF PROTEASE ENZYME FROM ÇİĞDEM (*CROCUS BIFLORUS*) TUBERS AND INVESTIGATION OF USABILITY OF THE PURIFIED PROTEASE ENZYME IN COAGULATION OF CASEIN

ABSTRACT

It is known that in some diseases (SARS, mad cow, pig and bird flu) that have passed from animals to humans have increased in recent years. In consumers, the use of animal proteases in the production of food products leads to concerns about the spread of these diseases. For these reasons, it has been an increase in demand for the product obtained from plant sources. The fact that only a small proportion of commercially available enzymes are herbaceous, have encouraged researchers to search for new herbal protease sources that can be used commercially. In this study, for the first time protease enzyme was purified from the tubers of a *Crocus biflorus* and characterized. The protease enzyme was purified 86 fold by ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. Optimum pH and temperature was found as 5.5 and 50 °C. The values of V_{max} and K_M were calculated as 47 mg/mL.min and 0.9 g/L, respectively. The molecular weight of the enzyme was calculated to be 35 kDa by using SDS-PAGE. It was determined that the purified enzyme can be used in the process of casein coagulation, the first step of cheese making.

Keywords: Çiğdem (*Crocus biflorus*), protease, coagulation, casein

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author:

✉ scelik@bayburt.edu.tr

☎ Telefon: (+90) 458 333 2028

☎ (+90) 458 333 2043

GİRİŞ

Proteazlar (proteolitik enzimler, peptidazlar) proteinlerde bulunan peptit bağlarının parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Proteaz enzimleri, peptid bağlarını peptid zincirinin uç kısımlarına yakın bölgelerden parçalayan (ekzopeptidazlar; E.C. 3.4.11-19) ve peptit zincirinin iç kısımdan parçalayan (endopeptidazlar; E.C. 3.4.21-25) olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Endopeptidazlar, enzimin aktif bölgesinde bizzat reaksiyona katılan aminoasitler ve kofaktöre göre 5 farklı grup altında toplanmaktadır. Reaksiyonu yürüten aminoasitlere göre proteazlar, serin proteaz (E.C. 3.4.21), sistein proteaz (E.C. 3.4.22), aspartik proteaz (E.C. 3.4.23), treonin proteaz (E.C. 3.4.25) ve kofaktör olarak metal kullandığı için metalproteaz (E.C. 3.4.24) olarak isimlendirilmiştir (Antão ve Malcata, 2005; Beynon ve Bond, 2000; Demir vd., 2005; Dubey ve Jagannadham, 2003; Sumantha vd., 2005). Proteaz enzimleri proteinlerin parçalanması gibi hayati bir reaksiyonu katalizlediği için mikroorganizmalar, bitkiler dâhil hemen hemen bütün canlılarda bulunmaktadır.

Proteaz enzimleri gıda, deterjan, ilaç ve deri endüstrilerinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu enzimler gıda sanayinde, protein hidrolizatlarının hazırlanmasında, peynir yapımında, ekmek, pizza ve bisküvi gibi unlu mamullerin hazırlanmasında, et yumuşatma işlemleri gibi çok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Proteazlar dünya enzim pazarında sahip olduğu %60'lık bir pay ile ilk sıralarda bulunmaktadır (Cavalcanti vd., 2004). Ayrıca dünyada kullanılan ticari enzimler ile ilgili pazar araştırma raporuna göre proteazların 6 milyar dolarlık bir paya sahip olduğu ve ticari olarak satılan proteazların bitkilerden, hayvanlardan ve mikrobiyal kaynaklardan üretildiği ifade edilmektedir (Menon vd., 2002).

Son yıllarda hayvanlardan insanlara geçen bazı hastalıklardan (SARS, deli dana, kuş gribi vs.) dolayı hayvansal proteazların özellikle gıda maddesi yapımında kullanımının endişelere yol açması, bitkisel kaynaklarından elde edilen ürünlere artan bir sosyal talebin olması ve ticari olarak satılan enzimlerin az bir kısmının bitkisel

kaynaklı olması, araştırmacıları ticari olarak da kullanılabilen yeni bitkisel proteaz kaynakları aramaya sevk etmiştir (Dubey ve Jagannadham, 2003; Roseiro vd., 2003).

Çok yıllık ve yumrulu bir bitki olan *Iridaceae*'nin (Süsengiller) Türkiye'nin birçok bölgesinde çok sayıda endemik türü bulunmaktadır. *Iridaceae*'in alt familyasından olan *Crocus* türleri (safran (*Crocus sativus*) hariç) Anadolu'da halk arasında çiğdem olarak bilinmektedir. Anadolu'da çiğdemlerin yumruları çiğ olarak veya pişirilerek yenilebilmektedir (Akyol vd., 2012).

Bu çalışmadaki amacımız, çiğdem bir türü olan ve Erzurum'da da yetişen *Crocus biflorus*'un yumrularından ilk kez proteaz enziminin saflaştırılması ve spesifik bazı özelliklerinin belirlenmesidir. Ayrıca kısmi olarak saflaştırılan enzimin, peynir yapımının ilk basamağı olan sütün çöktürülmesi ve kazeinin parçalanması deneylerinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Proteaz enziminin saflaştırılması

Çiğdemler Nisan ayında Erzurum'a bağlı İkizdere mevkiinde toplanıp yıkanarak topraklarından temizlenmiş ve saflaştırma işlemleri yapılana kadar -20 °C'de saklanmıştır. Çiğdem yumrularında bulunan proteaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır.

Bitkinin yumruları bıçakla küçük parçalara ayrılmış ve sıvı azotla dondurulduktan sonra toz haline gelene kadar havanda dövülmüştür. Bitkinin her bir gramına 3 mL saf su ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 dakika karıştırılmıştır. Homojenizat, 10.000xg'de santrifüjlenerek süpernatant alınmış ve amonyum sülfat ile çöktürme işlemlerinde kullanılmıştır. Süpernatant 0'dan %100'e kadar sırasıyla %0-40, %40-70, %70-100 aralıkları ile amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. En yüksek proteaz aktivitesi %40-70'lik çökekte bulunmuştur. Çökelek 0,02 M asetat (pH: 6) tamponu ile çözülüp aynı tampona karşı diyaliz edilmiştir. Dengelenmiş CM-sefaroze kolonuna yüklenmiştir. 0'dan 0,5 M NaCl bir derişim gradienti oluşturularak elüsyonlar alınmıştır. Aktif eluatlar

toplanarak karakterizasyon işlemleri için saklanmıştır.

Proteaz enziminin aktivite tayini

Proteolitik aktivite, substrat olarak kazein kullanılıp enzimin parçaladığı proteinin (kazein) miktarı belirlenerek hesaplanmıştır (Fadyloğlu, 2001). Bir EU, bir dakikada enzim tarafından parçalanmış proteinin μg miktarı olarak belirlenmiştir. pH'sı 6 olan 100 mL, 0,1 M'lık fosfat tamponuna 1 g kazein ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcıda karıştırılırken sıcaklık yavaş yavaş yükseltilmiştir. 80-85 °C sıcaklık aralığında 10 dakika boyunca karıştırılarak substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan substrat çözeltisi 4 °C'de saklandığında 10 gün boyunca kullanılabilir. Bir mL kazein çözeltisine 500 μL saf enzim çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Bu reaksiyon karışımı 50 °C'de 60 dakika inkübe edilmiş ve 3 mL %3'lük TCA ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Parçalanmayan proteinlerin 30 dakika boyunca çökmesi sağlanmıştır. Ardından 50 °C'de bekletilen 1 mL substratın üzerine önce 3 mL TCA ve hemen sonra 500 μL enzim çözeltisi ilave edilerek hazırlanan numuneler, kör olarak kullanılmıştır. Çöken proteinler 10.000xg'de 30 dakikada santrifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatanttan ayrılmıştır. Süpernatantta çökmeden kalan enzim tarafından parçalanmış proteinlerin miktarı, Bradford yöntemiyle tayin edilip enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Süpernatanttan 100 μL alınıp 1 mL comassie brilliant blue G boya çözeltisine ilave edilmiş ve 10 dakika sonra 595 nm de absorbanları okunmuştur. Aynı şartlar altında albümin ile standart grafik hazırlanmıştır. Standart grafik yardımıyla protein miktarı bulunarak EU hesaplanmıştır (Bradford, 1976).

Saflaştırılan enzimin özelliklerinin belirlenmesi

Bu amaç için %4-15 kesikli SDS PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez) kullanılarak (ThermoFisher Scientific; Owl™ Dual-Gel Vertical Electrophoresis Systems) saflaştırılan proteaz enziminin saflığı kontrol edilmiş ve molekül ağırlığı belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık belirlenmiştir. Enzim 10^{-1} ve 10^{-2}

olmak üzere iki farklı derişimde Fe^{3+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , SDS ve β -merkaptoetanölün enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. V_{max} ve K_M değerleri Lineveaver-Burk grafiğinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Ayrıca enzimin kazein dışındaki farklı doğal substratlar olan hemoglobin, albümin ve jelatin üzerindeki aktivitesi de araştırılmıştır.

Saflaştırılan proteaz enzimi ile kazeinin parçalanmasının incelenmesi

Saflaştırılan proteaz enziminin kazeini parçalaması SDS PAGE yapılarak kontrol edilmiştir. Bir mL substrata 0,5 mL enzim ilave edilip 50 °C'de 18 saat bekletilmiş ve 6., 12. ve 18. saatlerde 50'şer μL numune alınmıştır. Alınan numunelere, hiç beklenmeden 50 μL β -merkaptoetanöl içeren elektroforez numune tamponu ilave edilmiş ve numuneler, 10 dakika süreyle 95 °C'de kaynatılarak elektroforeze yüklenmeye hazır hale getirilmiştir. Kontrol numunesi için 1 mL substrat 50 °C'de 24 saat bekletilmiş ve 0,5 mL enzim ilave edildikten sonra diğer numunelerle aynı işleme tabi tutularak hazırlanmıştır. Her bir kuyuya 50'şer μL numune ve 10 μL ladder yüklenip 50 mA'de yaklaşık 40 dakika yürütülmüştür. Jel, boyama çözeltisi (0,1 g comassie brilliant blue R-250, %10 asetik asit, %40 metanol, %50 saf su) ile 2 saat boyunca boyandıktan sonra açma çözeltisi (%10 asetik asit, %40 metanol, %50 saf su) ile jelin zemin rengi açılıncaya kadar çalkalanmıştır.

Saflaştırılan enzimle rekonstitüe sütün çöktürülmesi

Çiğdem yumrularından kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin rekonstitüe sütü çöktürüp çöktürmediği araştırılmıştır. Bu amaçla Berridge metodunun modifiye şekli uygulanmıştır (Berridge, 1945). 10 g süt tozu 100 mL saf su ile karıştırılarak %10'luk rekonstitüe süt hazırlanmıştır. Bu karışımın bir kısmına, karışımın derişimi 10 mM oluncaya kadar CaCl_2 ilave edilmiştir. Hazırlanan rekonstitüe sütün 5'er mL'sine 1 mL enzim çözeltisi ilave edilmiş ve 50 °C'de bekletilmiştir. Kontrol amaçlı olarak, CaCl_2 'lü ve CaCl_2 'süz 5'er mL rekonstitüe süte 1 mL tampon çözelti ilave edilip aynı şartlar altında bekletilmiştir. Enzimin sütü ne kadar sürede çöktürdüğü araştırılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA**Proteaz enziminin saflaştırılmasına ait sonuçlar**

Proteaz enziminin çiğdem yumrularından amonyum sülfat çöktürmesi ve CM-sefaroze iyon

değişim kromatografisi kullanılarak 86 kat saflaştırıldığı hesaplanmış ve bu hesaplamalar çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Çiğdem yumrularından proteaz enziminin saflaştırılması

Table 1. Purification of protease from çiğdem tubers

	Hacim Volume (mL)	Aktivite Activity (EU/mL)	Toplam Aktivite Total Activity (EU)	Toplam Aktivite (%)	Protein Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite Specific Activity (EU/mg)	Saflaştırma Katsayısı Purification Coefficient
Homojenat <i>Homogenate</i>	232	0.01	2.32	100	0.617	0.016	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%80)	10	0.165	1.646	71	0.366	0.45	28
CM-sefaroze* <i>CM-sepharose</i>	10	0.14	1.41	61	0.102	1.37	86

*Karboksümetil sefaroze bir katyon değişim kolon kromatografisi materyalidir.

**Carboxymethyl sepharose is a cation exchange column chromatography material.*

Saflaştırılan enzimin özellikleri

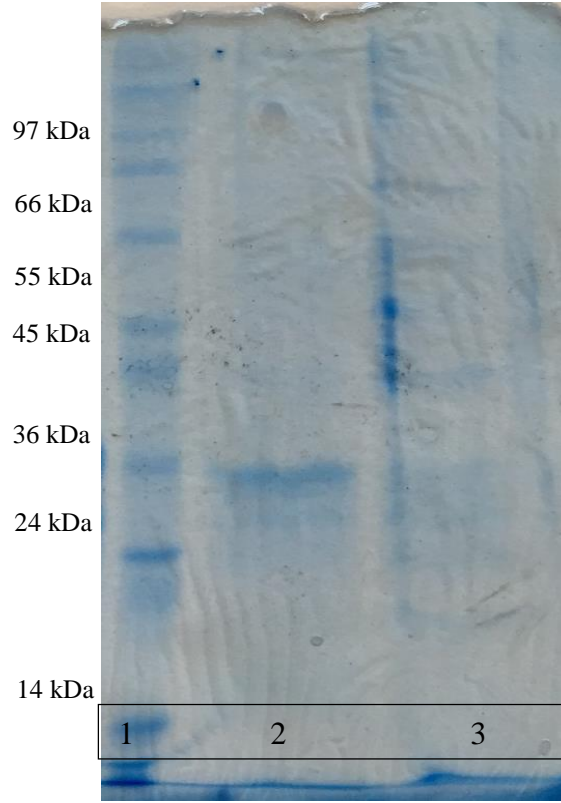
Çiğdem yumrularından saflaştırılan proteaz enziminin V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 47 mg/L.dak ve 0,9 g/L olarak bulunmuştur.

Saflaştırılan proteaz enziminin molekül ağırlığının, SDS PAGE kullanılarak 35 kDa olduğu hesaplanmıştır. SDS PAGE jelinin fotoğrafı şekil 1’de sunulmuştur. Bir kauçuk ağacı olan *Stebulus asper*’den saflaştırılan proteaz enziminin molekül ağırlığının 64 kDa (Tripathi vd., 2011), *Capparis spinosa*’den saflaştırılan proteaz enziminin molekül ağırlığının 46 kDa (Demir vd., 2008), *Helianthus annuus*’den (ayçiçeği) saflaştırılmış proteaz enzimlerinin molekül ağırlıklarının ise 62 ve 120 kDa olduğu hesaplanmıştır (Nasr vd., 2016). Bu sonuçlardan da görüleceği gibi bitkilerden saflaştırılan proteaz enzimlerinin molekül ağırlıkları farklılık göstermektedir.

Çiğdem yumrularından saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH’sının 5,5 olduğu şekil 2’de ve optimum sıcaklığının ise 50 °C olduğu şekil 3’te verilen eğrilerde görülmektedir. Ayrıca enzimin 5-9 pH ve 10-70°C sıcaklık aralığında aktif olduğu belirlenmiştir. Bruno vd. (2010) *Bromelia hieronymi*’den saflaştırdıkları proteaz enziminin optimum sıcaklığını 30 °C ve optimum pH’sını 5, Tripathi vd. (2011) *Stebulus asper*’den saflaştırdıkları

proteaz enziminin optimum sıcaklığını 65 °C ve optimum pH’sını 2-4 ve Demir vd. (2008) *Capparis spinosa*’dan saflaştırdıkları proteaz enziminin optimum sıcaklığını 60 °C ve optimum pH’sını 6,5 olarak bulmuşlardır. Literatürdeki bu çalışmalarda saflaştırılan proteaz enzimleri, bu çalışmada elde edilen proteaz enzimi gibi asidik pH’larda maksimum aktivite göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık, yukarıda verilen iki çalışmadan daha düşük olmasına rağmen belirtilen sıcaklık enzimler için yüksek bir değerdir. Sütün pH’sının asidik olması ve çiğdem yumrularından saflaştırılan proteaz enziminin de asidik pH’larda maksimum aktivite göstermesi, saflaştırılan bu enzimin süt ürünlerinin işlenmesi için uygun olabileceğini göstermektedir. Ayrıca enzimin, geniş sıcaklık ve pH aralığında aktivitesini koruması endüstriyel işlemlerin farklı alanlarında kullanılabileceğini de göstermektedir.

Çiğdem yumrularından saflaştırılan proteaz enziminin başka substratlar üzerinde aktif olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla substrat olarak hemoglobin, jelatin ve albümin kullanılmıştır. Enzimin hemoglobini, albümini ve jelatini de parçaladığı bulunmuştur.

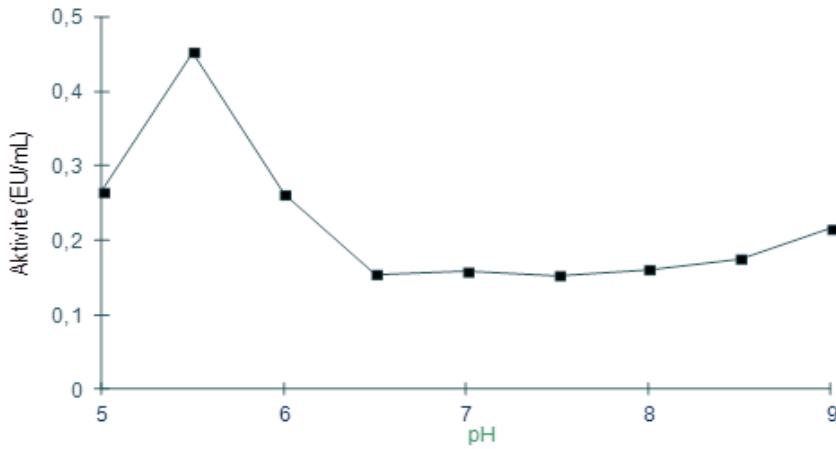


Şekil 1. Çiğdem yumrularından saflaştırılan proteaz enziminin SDS PAGE* görüntüsü. (1. kuyu: marker, 2. kuyu: saf proteaz, 3. kuyu: Homojenat)

*Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

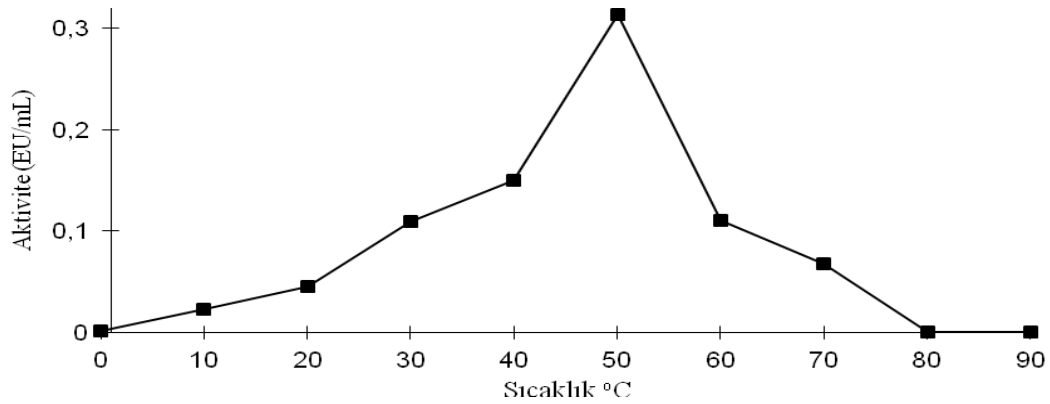
Figure 1. SDS PAGE* of purified protease from çiğdem tubers. (Lane 1: Ladder, Lane 2: Purified Protease, Lane 3: Homogenate)

* Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis



Şekil 2. Çiğdem yumrularından saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Figure 2. The effect of pH on activity of purified protease enzyme from çiğdem tubers



Şekil 3. Çığdem yumrularından saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi
 Figure 3. The effect of temperature on activity of purified protease enzyme from çığdem tubers

Çığdem yumrularından saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine 10^{-1} ve 10^{-2} M derişimlere sahip metal iyonlarının ve bazı kimyasalların etkisi çizelge 2 verilmiştir. Ca^{2+} ve Mg^{2+} 'nin her iki derişimde de enzimin aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. Fe^{3+} ve SDS'nin 0,1 M derişimde enzimi tamamen inhibe ettikleri ve Fe^{3+} iyonlarının 0,01 M derişimde ise enzimin aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesini Zn^{2+} iyonlarının her iki derişimde de etkilemediği β -merkaptoetanolün ise 0,01 M derişimde enzimin aktivitesine etki etmezken 0,1 M derişimde aktiviteyi arttırdığı belirlenmiştir.

Saflaştırılan proteaz enzimi ile kazeinin parçalanmasına ait sonuçlar

Saflaştırılan proteaz enziminin kazeini 6, 12 ve 18 saat süreyle hidrolizinin SDS-PAGE görüntüsü şekil 4'te verilmiştir. Sığır kazeinin α , β ve κ olmak üzere üç türü bulunmaktadır. α kazein α -s1 22.0-23.7 kDa ve α -s2 25.2 kDa, β kazein 23.9-24.0 kDa ve κ kazein 19 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu bilinmektedir (Modler, 1985). Kontrol amacıyla ekilen 4 numaralı kuyuda 20 ile 35 kDa arasında bulunan bantların, kazeinle ilgili literatürde verilen bilgilerle uyum içinde olduğu görülmüştür. Kazeinin 6. saatte sonlandırılan hidrolizinde 15 kDa civarında yeni bir bandın görünmeye başladığı ve 18. saatte daha da belirginleştiği tespit edilmiştir. Eş zamanlı olarak α ve β -kazein bantlarının küçüldüğü κ -kazein

bandının hemen hemen yok olduğu görülmüştür. Creamer vd. (1998) tarafından yapılan çalışmada, κ -kazein hidrofobik olan α ve β kazein misellerini sararak kazeinin çözünürlüğünü artırdığını, peynir yapımında κ -kazeinin hidrolizlenmesi ile hidrofobik kazein yapılarının ortaya çıktığını ve böylece sütün çökmesinin sağlandığını ifade etmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada, SDS PAGE jelinde en küçük moleküle sahip (κ kazein: 19 kDa) olan kazein bandının 18. saatte hemen hemen yok olduğunun görülmesi enzimin, sütün çöktürülmesi işlemlerinde kullanılabileceğini göstermektedir.

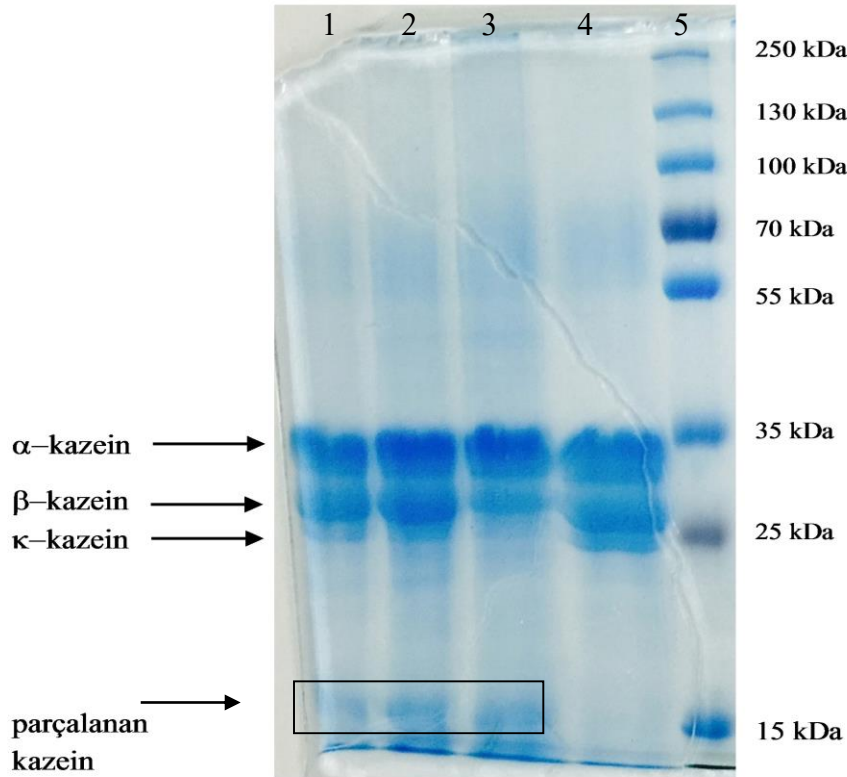
Saflaştırılan enzimle rekonstitüe sütün çöktürülmesine ait sonuçlar

Ayrıca amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırılan proteaz enziminin rekonstitüe sütün kaç saatte çöktürdüğü araştırılmıştır. Bu amaçla 10 mM $CaCl_2$ içeren %10'luk rekonstitüe sütün ve %10'luk rekonstitüe sütün olmak üzere iki farklı ortamda deneyler yürütülmüştür. Numuneler proteaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği $50^\circ C$ 'de bekletilmiştir. $CaCl_2$ içeren deneyde enzimin 3. saatten itibaren rekonstitüe sütün çöktürmeye başladığı ve bir saat içinde rekonstitüe sütün tamamen çöktüğü görülmüştür. $CaCl_2$ içermeyen rekonstitüe sütün ise 6. saatten itibaren çökmeye başlamıştır. Rekonstitüe sütün enzim tarafından çöktürüldüğü tüplerin fotoğrafları şekil 5 verilmektedir.

Çizelge 2. Çiğdem yumrularından saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine FeCl₃, CaCl₂, ZnCl₂, MgCl₂, SDS ve β-merkaptoetanolün etkisi

Table 2. The effect of FeCl₃, CaCl₂, ZnCl₂, MgCl₂, SDS ve β-mercaptoethanol on activity of purified protease from çiğdem tubers

	Derişim Concentration	Protease Aktivite (%) Protease Activity
Kontrol Control		100
CaCl ₂	10 ⁻¹ mM	149
	10 ⁻² mM	155
MgCl ₂	10 ⁻¹ mM	189
	10 ⁻² mM	196
FeCl ₃	10 ⁻¹ mM	0
	10 ⁻² mM	148
ZnCl ₂	10 ⁻¹ mM	103
	10 ⁻² mM	95
SDS	10 ⁻¹ mM	0
	10 ⁻² mM	85
β-merkaptoetanol	10 ⁻¹ mM	155
	10 ⁻² mM	95

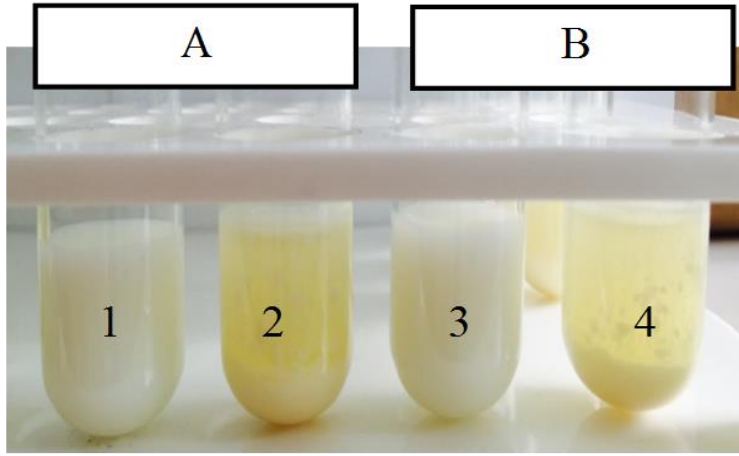


Şekil 4. Çiğdem yumrularından saflaştırılan proteaz enziminin kazeini hidrolizlemesinin SDS PAGE* görüntüsü. (1. kuyu: 6 saat hidroliz edilen numune, 2. kuyu: 12 saat hidroliz edilen numune, 3. kuyu: 18 saat hidroliz edilen numune, 4. kuyu: kontrol ve 5. kuyu: marker)

*Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

Figure 4. SDS PAGE* pattern of hydrolysis of casein with protease enzyme from çiğdem tubers. (Lane 1: 6 hours hydrolyzed sample, lane 2: 12 hours hydrolyzed sample, lane 3: 18 hours hydrolyzed sample, lane 4: blank and lane 5: ladder)

*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis



Şekil 5. Çığdem yumrularından saflaştırılan proteaz enzimi ile rekonstitüe sütün çöktürülmesi. (A (%10'luk rekonstitüe süt); 1: enzimli deneme, 2: kontrol. B (10 mM CaCl₂ içeren %10'luk rekonstitüe süt); 3: enzimli deneme, 4: kontrol)

Figure 5. Clotting reconstituted milk with protease from çığdem tubers. (A (10% reconstituted milk); 1: sample, 2: blank. B (10% reconstituted milk containing 10 mM CaCl₂); 3: sample, 4: blank)

SONUÇ

Çığdem yumrularından proteaz enzimi başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır. Saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH' sı 5,5 ve optimum sıcaklığı 50 °C olarak bulunmuştur. Enzimin V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 47 mg/L.dak ve 0,9 g/L ve molekül kütlesi 35 kDa olarak hesaplanmıştır. Çığdem yumrularından elde edilen enzimin, kazeini parçaladığı SDS PAGE yapılarak belirlenmiş ve ayrıca enzimin rekonstitüe sütü başarılı bir şekilde çöktürdüğü bulunmuştur. Bu sonuçlar, çığdem yumrularından elde edilen proteaz enziminin peynir yapımının ilk basamağı olan süt çöktürme işleminde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

Akyol, Y., Yetişen, K., Özdemir, C., Bozdağ, B., & Kocabaş, O. (2012). Türkiye'deki *Crocus biflorus* miller subsp. tauri (maw) mathew (Iridaceae) üzerine morfolojik ve anatomik bir çalışma. *Iğdır Univ J Inst Sci Tech*, 2: 15-20.

Antão, C. M., & Malcata, F. X. (2005). Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol Biochem*, 43(7): 637-50. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.05.001>

Barrett A. J. (2000) Proteolytic enzymes: nomenclature and classification, In: *Proteolytic Enzymes. Biochemical Education*. Beynon, R., Bond, J. S. (chief eds.), Volume 18, Oxford University Press, the USA, pp. 1-20. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(90\)90038-P](https://doi.org/10.1016/0307-4412(90)90038-P)

Berridge, N. J. (1945). The purification and crystallization of rennin. *Biochem J*, 39(2):179-86.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.

Bruno, M. A., Lazza, C. M., Errasti, M. E., López, L. M. I., Caffini, N. O., & Pardo, M. F. (2010). Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT - Food Sci Technol*, 43(4): 695-701. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.003>

Cavalcanti, M. T. H., Teixeira, M. F. S., Lima Filho, J. L., & Porto, A. L. F. (2004). Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardopsis* sp. *Bioresour Technol*, 93(1): 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.003>

- Creamer, L. K., Plowman, J. E., Liddell, M. J., Smith, M. H., & Hill, J. P. (1998). Micelle Stability: κ -Casein Structure and Function. *J Dairy Sci*, 81(11): 3004-3012. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75864-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75864-3)
- Demir, Y., Alaylı, A., Yildirim, S., & Demir, N. (2005). Identification of protease from *Euphorbia amygdaloides* latex and its use in cheese production. *Prep Biochem Biotechnol*, 35(4): 291-299. <https://doi.org/10.1080/10826060500218107>
- Demir, Y., Güngör, A. A., Duran, E. D., & Demir, N. (2008). Cysteine protease (Capparin) from capsules of caper (*Capparis spinosa*). *Food Technol Biotechnol*, 46(3): 286-291.
- Fadıloğlu, S. (2001). Immobilization and characterization of ficin. *Nahrung - Food*, 45(2): 143-146. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20010401\)45:2<143::AID-FOOD143>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20010401)45:2<143::AID-FOOD143>3.0.CO;2-8)
- Kumar Dubey, V., & Jagannadham, M. V. (2003). Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. *Phytochemistry*, 62(7): 1057-1071. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00676-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00676-3)
- Menon, M., Vithayathil, P. J., Raju, S. M., & Ramadoss, C. S. (2002). Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, "f." *Plant Sci*, 163(1): 131-139. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00085-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00085-7)
- Modler, H. W. (1985). Functional Properties of Nonfat Dairy Ingredients - A Review. Modification of Products Containing Casein. *J Dairy Sci*, 68(9): 2195-2205. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81091-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81091-2)
- Nasr, A. I. A. M., Mohamed Ahmed, I. A., & Hamid, O. I. A. (2016). Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Food Sci Nutr*, 4(5): 733-741. <https://doi.org/10.1002/fsn3.338>
- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., & Wilbey, R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants - The use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *Int J Dairy Technol*, 56(2): 76-85. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x>
- Sumantha, A., Sandhya, C., Szakacs, G., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2005). Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technol Biotechnol*, 43(4): 313-319.
- Tripathi, P., Tomar, R., & Jagannadham, M. V. (2011). Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin. *Food Chem*, 125(3): 1005-1012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.108>