

Organik Atıklardan Elde Edilen Besiyerinde Üreyen *Aspergillus niger*'den Proteaz Enzimi Üretimi ve Karakterizasyonu

Betül Tekyıldız¹ , Özge Aslan² , Arzu Çağrı Mehmetoğlu²  

¹Deva Holding, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kartepe, Kocaeli

²Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kemalpaşa, Esentepe Kampüsü Serdivan, Sakarya

Geliş Tarihi (Received): 27.04.2024, Kabul Tarihi (Accepted): 06.03.2025

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): acagri@sakarya.edu.tr (A. Çağrı Mehmetoğlu)

☎ 0 264 295 59 50 📠 0 264 295 59 20

ÖZ

Ticari enzim pazarında önemli bir yeri olan proteolitik enzim grubundan proteazlar, geniş ve farklı biyoteknolojik uygulamaları nedeniyle yüksek talep gören bir enzim grubudur. Bu enzimlerin küfler kullanılarak fermentasyon yoluyla üretilmesi tercih edilen bir yöntemdir. Çünkü, enzimlerin konsantre halde ekstraselüler olarak üretilmesiyle geri kazanımı daha kolay ve maliyet açısından daha elverişli bir üretim yöntemi olmaktadır. Bu nedenle çalışmada, organik çöpler substrat olarak kullanılarak *Aspergillus niger*'den proteazların üretimine alternatif oluşturmak ve enzimin saflaştırılmasına bir temel oluşturmak amaçlanmıştır. Araştırmada, *A. niger* inoküle edilen %50 protein oranında organik atıklardan hazırlanan besiyerinin, 30°C'de 24 saat inkübasyon süresinde, pH 5.5'te enzim üretimi için optimum besiyeri olduğu tespit edilmiştir. *A. niger*'den üretilen proteaz enzimi geniş bir uygulama alanına sahip, çok yönlü bir biyo-ayırma aracı haline gelen, yüksek geri kazanım ve saflık seviyelerine sahip bir dizi enzim ve proteini saflaştırmak için kullanılan üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile kısmen saflaştırılmış ve biyokimyasal karakterizasyonları incelenmiştir. TPP sistemi ile proteaz enzimi 1.0:1.5 (ham enzim çözeltisi: t-bütanol oranı) ve %80 doygun amonyum sülfat konsantrasyonu ile %235.7 verimle 13.15 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı MALDI-TOF yöntemiyle 15.56 kDa olarak belirlenmiştir. *A. niger*'den saflaştırılan proteaz enziminin optimum ve stabil pH'ları sırasıyla 10.0 ve 9.0 iken optimum ve stabil sıcaklığı ise 60°C olmuştur. Okside edici ajanlar, yüzey aktif maddeleri, inhibitör ve substrat varlığı proteaz enziminin aktivite değerlerinde azalmaya neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Proteaz, *Aspergillus niger*, Üçlü faz ayırma sistemi (TPP), Taguchi

Protease Enzyme Production and Characterization from *Aspergillus Niger* Grown in Medium Obtained from Organic Waste

ABSTRACT

Proteases, a subgroup of proteolytic enzymes with a significant role in the commercial enzyme market, are in high demand due to their broad and diverse biotechnological applications. Fermentation using molds is a preferred method for producing these enzymes because their extracellular production in a concentrated form facilitates easier recovery, making the process more cost-effective. Therefore, this study aims to provide an alternative approach for the production of proteases from *Aspergillus niger* using organic waste as a substrate and to establish a basis for enzyme purification. In this study, the optimal medium for enzyme production was determined as a culture medium prepared from organic waste with a 50% protein content, inoculated with *A. niger*, and incubated at 30°C for 24 h at pH 5.5. The protease enzyme produced from *A. niger* was partially purified using the three-phase partitioning (TPP) system, which has become a versatile bio-separation tool with broad applications, high recovery rates, and high purity levels. Using the TPP system, the protease enzyme was purified 13.15-fold with a yield of 235.7% under conditions of a 1.0:1.5

ratio (crude enzyme solution: t-butanol) and 80% ammonium sulfate saturation. The molecular weight of the enzyme was found to be 15.56 kDa using the MALDI-TOF method. The optimum and stable pH values of the purified protease enzyme from *A. niger* were determined as 10.0 and 9.0, respectively, while the optimum and stable temperature was 60°C. The presence of oxidizing agents, surfactants, inhibitors, and substrates caused a decrease in the enzyme activity values.

Keywords: Protease, *Aspergillus niger*, Triple phase separation system (TPP), Taguchi

GİRİŞ

Enzimler, biyokimyasal katalizörler olarak çalışan ve reaksiyonları yüksek verimle gerçekleştiren biyomoleküllerdir. Canlı organizmalar tarafından spesifik biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştirmek amacıyla üretilirler [1]. Enzimlerin büyük kısmı, enzimatik aktivite için gerekli olan ve protein yapısında bulunmayan kofaktörlere bağımlı iken, bazıları yalnızca protein yapısıyla fonksiyon gösterir. Endüstrinin hemen hemen her alanında enzimlere ihtiyaç duyulmakta olup, bu enzimler genellikle mikrobiyal kökenlidir. Mikrobiyal kökenli enzimlerin tercih edilmesinin sebebi, hayvansal ve bitkisel enzimlere kıyasla daha yüksek kalitatif aktivite göstermeleridir. Ayrıca mikrobiyal enzimler diğerlerine göre daha dayanıklı, ekonomik ve daha büyük çapta üretilebilir [2]. Enzimler, tekstil, kâğıt, içecek ve yiyecek, deterjan, deri, hayvan yemi, yakıt, ilaç, kozmetik gibi çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Mikrobiyal enzim grubu içinde olan proteaz, aminoasitlerin oluşumu ve protein katabolizması için gereklidir. Proteinlerin peptit bağlarının hidrolizini katalize eden bu enzim, proteolitik enzimler veya peptidazlar olarak adlandırılır. Peptitleri ve amino asitleri serbest bırakır ve gıdanın bileşimi, süreci ve bozulması üzerindeki etkileri nedeniyle gıda endüstrisinde önemli bir rol oynar. Fonksiyonel ve aktif gruplarına göre altı ana başlık altında sınıflandırılır: serin proteazlar, sistein proteazlar, metalloproteazlar, aspartilproteazlar, treonin proteazlar ve glutamik asit proteazlar [3].

Biyoteknoloji alanındaki endüstriyel enzim araştırmaları giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bunun başlıca sebepleri arasında enzim teknolojisinin gelişmesi, ürün kullanım alanlarının genişlemesi ve ekonomik değerinin artması yer almaktadır. Son yıllarda, bu çalışmaların bir kısmı atıklardan enzim üretimi üzerine yoğunlaşmıştır. Dünya genelinde nüfus artışına paralel olarak atık miktarı da hızla yükselmekte ve bu atıkların değerlendirilmesi çevresel açıdan büyük önem taşımaktadır. Özellikle meyve ve sebzelerden kaynaklanan biyolojik olarak parçalanabilir atıkların yılda yaklaşık 50 milyon ton olduğu tahmin edilmektedir ve bunun sadece %0.5'i endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır. Bu nedenle, endüstriyel süreçlerin yan ürünü olarak oluşan atıkların değerlendirilmesi çevresel ve ekonomik açıdan önemlidir. Bu kapsamda, Madhumithah ve ark. [4] bitkisel atıklar, Oyeleke ve ark. [5], bakliyat atıkları; Lanka ve ark. [6] hayvansal protein kaynaklı süt ürünleri atıklarını kullanarak *Aspergillus niger*'den proteaz üretimini araştırmıştır. Benzer şekilde bu çalışma da organik atıkların *A. niger* tarafından proteaz üretimi için kullanılabilirliğini değerlendirilmeyi

ve enzim üretimini ekonomik olarak teşvik etmeyi amaçlamaktadır.

Bu çalışmada proteaz enzimini saflaştırmak için üçlü faz ayırma (TPP) yöntemi kullanılmıştır. TPP, geniş bir uygulama alanına sahip, protein çökeltmesinin pek çok basamağını kapsayan çok yönlü bir biyo-ayırma aracı olarak yüksek geri kazanım ve saflık seviyelerine sahip bir dizi enzim ve proteini saflaştırmak için kullanılmaktadır. Proteaz, invertaz, pektinaz, a-galaktosidaz, tripsin inhibitörü, lakkaz, katalaz gibi enzimlerin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan TPP yönteminin mekanizması tam olarak literatürde tanımlanmamış olsa da, salting out, ozmotik elektrostatik kuvvetler, kozmotropik çökeltme, izo-iyonik çökeltme, konformasyon sıkışması ve protein hidrasyon kaymaları gibi çeşitli ayırma işlemlerinin kombinasyonlarından oluştuğu belirtilmektedir [8].

Bu çalışmanın amaçlarından biri de Taguchi test metodu kullanılarak organik atıklardan elde edilen besiyerlerinde *A. niger* fermentasyonu ile üretilen proteaz enzimlerinin en verimli koşulları belirlemek ve geleneksel yöntemlere göre daha basit, verimli, ekonomik ve tek adımda yüksek geri kazanımla saflaştırılabilen TPP yöntemi ile proteaz enziminin saflaştırılmasının karakterizasyonunu yapmaktır.

MATERYAL ve METOT

Kullanılan Mikroorganizma

A. niger MRC 200806 saf kültürleri TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Küf Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. Saf kültürler 650 µL gliserol, 350 µL Tryptic Soy Broth (TSB) içinde -18°C'de muhafaza edilmiştir.

Küfün Çoğaltılması

Sporulasyon ortamı olarak TSA (Tryptic Soy Agar) besiyeri kullanılmıştır. Seyreltilmiş örnekler, steril öze kullanılarak TSA içeren petri kaplarına çizgi ekim yöntemiyle inoküle edilmiştir. Kültürler, 30°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, gelişen kolonilerden 100 µL alınarak 7 mL TSB (Tryptic Soy Broth) besiyerine inoküle edilmiş ve 30°C'de 72 saat boyunca inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Elde edilen kültür, enzim üretiminde inokulum kaynağı olarak kullanılmıştır.

Uygun Besiyeri İçeriğinin Belirlenmesi

Proteaz üretimi için en uygun besiyeri koşullarını belirlemek amacıyla Taguchi (3x3) deney tasarımı

yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemin temel adımları; faktörlerin ve etkileşimlerin belirlenmesi, her bir faktörün farklı seviyelerinin tanımlanması, uygun ortogonal matrisin seçilmesi, etkileşimlerin ve faktörlerin matrise aktarılması, deneylerin gerçekleştirilmesi, elde edilen verilerin analizi, optimal koşulların belirlenmesi ve

doğrulama deneylerinin yapılması şeklinde özetlenebilir [9]. *A. niger* kültürü, Taguchi yöntemine göre tasarlanan deney düzeninde, Tablo 1'de belirtilen faktörler doğrultusunda üç paralel analiz ile proteaz aktivitesi açısından değerlendirilmiştir.

Tablo 1. Proteaz üretimi için kullanılan fermentasyon koşulları

Table 1. Fermentation conditions used for protease production

Hayvansal Protein (%) - Bitkisel Protein (%)	pH	İnkübasyon Süresi (saat)
50-50	5.0	24
50-50	5.5	48
50-50	6.0	72
60-40	5.0	48
60-40	5.5	72
60-40	6.0	24
70-30	5.0	72
70-30	5.5	24
70-30	6.0	48

Sakarya YURTKUR Kız Öğrenci Yurdu Yemekhanesi'nden toplanan gıda artıkları (Tablo 2), hayvansal-bitkisel protein, meyve-sebze ve polisakkarit ağırlıklı olarak sınıflandırılmış ve blender yardımıyla püre haline getirilerek toplam 50 g olacak şekilde

karışım hazırlanmıştır. Karışıma 100 mL saf su eklenmiş ve homojen bir kıvam elde etmek amacıyla tekrar blender ile işlem görmüştür. Elde edilen besiyeri, gıda partiküllerinden arındırılarak pürüzsüz bir yapı elde etmek için No:1 Whatman™ filtre kağıdı ile süzölmüştür.

Tablo 2. Besiyeri kompozisyonunda yer alan biyolojik atıkların içeriği

Table 2. Composition of biological waste in the growth medium

1. Sebze ve meyve ağırlıklı atıklar	Kabak, havuç, lahana (çiğ ve turşu), domates (çiğ ve konserve), biber (kappa, çarliston), patlıcan, soğan, patates, karnabahar, maydanoz, marul, dereotu, roka, nane, pırasa biberiye, kereviz, mandalina, portakal, limon, karpuz, muz, ananas, igde, elma, ayva, Trabzon hurması, armut, greylift, kivi
2. Hayvansal Protein ağırlıklı atıklar	Mantar, yumurta (çiğ ve haşlanmış), peynir (beyaz peynir, kaşar peyniri), kırmızı et, tavuk eti
3. Bitkisel Protein ağırlıklı atıklar	Kuru fasulye yemeyi, nohut yemeyi, yeşil mercimek, bezelye, börülce
4. Polisakkarit ağırlıklı atıklar	Ekmek (kepekli, çavdar, beyaz, tam buğday), kek, pankek, simit, poğaç (dereotlu, kaşarlı, domatesli), açma, üzümlü çörek, kruvasan (çikolatalı ve sade), şekerli çörek, ay çöreği.

Besiyerinin pH değeri deney düzenine uygun olarak 5.0, 5.5 ve 6.0 seviyelerine ayarlanmış, ardından her biri 30 mL fermentasyon ortamı içerecek şekilde 100 mL'lik Eppendorf® tüplerine aktarılmıştır. Sterilizasyon amacıyla 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Soğutulmuş besiyerleri, 8 mm çapında *A. niger* kültürü ile inoküle edilerek vortekslenmiştir. İnoküle edilen tüm besiyerleri, 30°C'de 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Fermentasyon süresi sonunda, biyolojik kabin içerisinde Buhner hunisi kullanılarak No:1 Whatman™ filtre kağıdı yardımıyla süzme işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen süzöntü ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Her bir süzöntünün proteaz aktivitesi ölçülmüş ve tüm analizler üç paralel tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

Proteaz Enziminin Üçlü Faz Ayırma Yöntemi Kullanılarak Saflaştırılması

Optimum koşullarda enzim üretimi gerçekleştirildikten sonra, fermentasyon ortamındaki küf miselleri filtre kağıdı kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Homojenattaki

hücre kalıntılarının giderilmesi amacıyla, süzöntü 5000 rpm'de, 24°C'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Enzim saflaştırma sürecinde, optimum amonyum sülfat/t-bütanol oranını belirlemek için homojenattan her bir tüpe 2 mL aktarılmış ve farklı amonyum sülfat doygunluk seviyelerine (%30, %40, %50, %60, %70, %80 ve %90) ayarlanmıştır. Ardından, her tuz konsantrasyonu için farklı homojenat/t-bütanol oranları (1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5 ve 1.0:2.0) hesaplanarak uygun hacimde t-bütanol eklenmiş, her ekleme sonrası vorteksleme işlemi uygulanmıştır. Numuneler oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş ve üç fazın oluştuğu gözlemlenmiştir. Bunu takiben, çözeltiler 5000 rpm'de, 24°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz pastör pipeti ile ayrılmış, kalan orta ve alt fazlar ayrı tüplere aktarılmıştır. Son olarak, bu fazların protein tayini ve enzim aktivitesi analizleri gerçekleştirilmiştir.

Proteazların Enzim Aktivitesi

Proteaz enziminin aktivitesi, substrat olarak kazein kullanılan modifiye bir yöntemle belirlenmiştir [2].

Yöntemde, %0.65 konsantrasyonda hazırlanan kazeinden 2.5 mL alınarak üzerine 0.5 mL enzim çözeltisi eklenmiştir. Reaksiyon karışımı, 37°C'de su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Kontrol (kör) için enzim çözeltisi yerine Tris-HCl tampon (100 mM, pH 8.5) kullanılmıştır. İnkübasyonun ardından reaksiyonu durdurmak için 2.5 mL 110 mM TCA çözeltisi eklenmiş ve karışım tekrar 37°C su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. Bu işlemi takiben karışım 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, oluşan süpernatanttan 1 mL alınmıştır. Süpernatanta 2.5 mL Na₂CO₃ (0.5 M) çözeltisi ve 0.5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (0.5 M) eklenerek karışım bir kez daha 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda, reaksiyon karışımının absorpsiyon değerleri 660 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. 37°C ve pH 8.5 koşullarında gerçekleşen hidroliz sırasında, %0.65 kazeinden dakikada 1 µg tirozin açığa çıkması için gereken enzim miktarı, bir ünite proteaz aktivitesi (U/mL) olarak tanımlanmıştır.

Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

Seyreltilmiş BSA örneklerinin üzerine hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden 2 mL eklenmiş ve vortekslenmiştir [2]. On dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okunmuş ve elde edilen değerlerle protein standart grafiği çizilmiştir. Numunelerdeki bilinmeyen protein konsantrasyonları, bu grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

Moleküler Ağırlığı

Saflaştırılan proteaz enziminin moleküler ağırlığı MALDI-TOF cihazı kullanılarak hesaplanmıştır. Saflaştırılmış numunenin analizi için numune 500 µL (1/1/1 asetonitril/ultra saf su/ethanol) karışım kullanılarak seyreltilmiştir. Matriks için ise iki farklı şekilde; 5 mg CHCA (α-siyano-4-hidroksisinnamik asit), 10 mg sinapik asit (3,5-dimetoksi-4-hidroksisinnamik asit) kullanılmıştır. Matriksler 1000 µL (50.0/50.0/0.1 asetonitril/ ultra saf su/ trifloroasetik asit) karışım kullanılarak seyreltilmiştir. Analiz işlemi 0.5 mL numune ve 0.5 mL matriks karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Analizde kullanılan aralıklar: 'Mass Range' 1000-4000 Da, 'Max Laser Repetition Rate' 50, 'Power' 95, Profile 100, 'Shots' 20, 'Pulsed Extraction Optimised at' (Da) 2300 olarak bildirilmiştir.

Saflaştırılan Enzimin Özellikleri

Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerini belirlemek amacıyla, 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.5) içerisinde %0.65 konsantrasyonunda hazırlanan kazein çözeltisinden 2.5 mL alınarak üzerine 0.5 mL enzim çözeltisi eklenmiştir. Enzim aktivitesinin belirlenmesi için reaksiyon karışımları 20°C'den 80°C'ye kadar farklı sıcaklıklarda 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, enzim aktivite değerleri hesaplanarak optimum sıcaklık belirlenmiştir. Optimum pH değerinin tespiti için, %0.65 kazein içeren farklı tampon çözeltileri hazırlanmıştır:

Sodyum fosfat tamponu (pH 6.0-8.0), Tris-HCl tamponu (pH 7.0-9.0) ve glisin-NaOH tamponu (pH 9.0-11.0). Bu çözeltilere 0.5 mL enzim eklenerek, 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, proteaz aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Proteaz enziminin aktif bölgesindeki katalizden sorumlu amino asitlerin varlığını tespit etmek için, enzim %1 ve %8 oranında üre, %1 ve %5 oranında inhibitörler (beta-merkaptotanol, serin proteaz inhibitörü PMSF ve metaloproteaz inhibitörü EDTA), %1 ve %5 oranında yüzey aktif maddeler (Tween 80, Tween 20, SDS, Triton X-100) ve oksitleyici madde H₂O₂ ile muamele edilmiştir. Enzim çözeltileri, ilgili kimyasallarla 30 dakika inkübe edildikten sonra aktivite ölçümleri yapılmıştır. Enzimin doğal substratlara karşı aktivitesini incelemek amacıyla, 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.5) içerisinde hazırlanan %0.65 konsantrasyonundaki hemoglobin, kazein, BSA, azokazein ve jelatin substratları kullanılmıştır. Farklı substratlar varlığında enzim aktivite değişimleri analiz edilerek, enzimin substrat spesifikliğı değerlendirilmiştir.

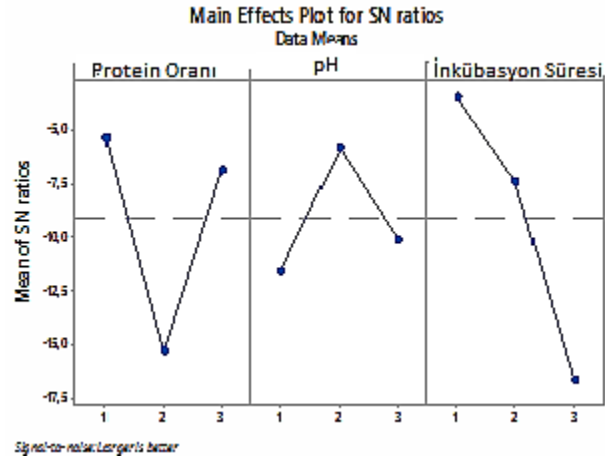
İstatistiksel Analiz

Analizlerden alınan değerler, 3 tekrarın ortalamasıdır. Çalışmada istatistiksel analizler Minitab (18.0 versiyon, State College, PA, ABD) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler varyans analizi (tek-yönlü ANOVA) ile analiz edilmiş, istatistiksel farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi yardımıyla p <0.05 düzeyinde belirlenmiştir.

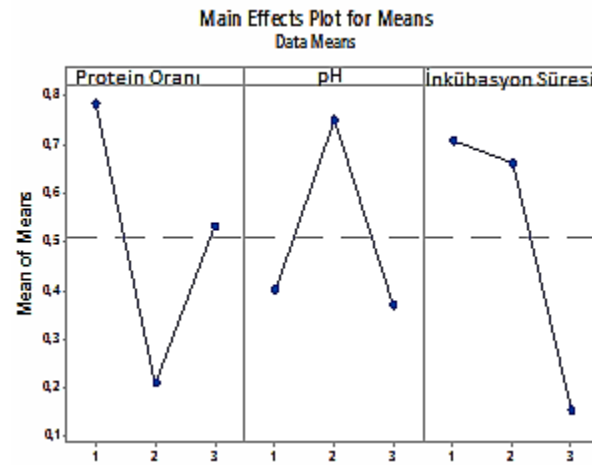
BULGULAR ve TARTIŞMA

Proteaz Enziminin Üretimi

Taguchi yöntemi kullanılarak yapılan hesaplamalara göre parametrelerin optimum seviyeleri çoğunlukla S/N oranının en büyük olduğu seviyelerde meydana gelmektedir ve grafikler incelendiğinde protein oranı parametresinde en yüksek piki birinci seviyenin verdiği görülmektedir (Şekil 1 ve 2). Grafikler incelendiğinde %50-50 protein oranının aktivite tayininde en yüksek değeri verdiği gözlenmiştir. pH parametresinde proteaz enzimi üretimi için optimum değerin 5.5 olduğu tespit edilmiştir. *A. niger*'in proteaz enzimi üretimi için optimum inkübasyon süresi ise 24 saat olarak bulunmuştur. Çalışmada inkübasyon süresi arttıkça enzim üretiminin düşmesi kullanılan katı substrat yapısının zamana bağlı olarak bozulması ve ortamdaki diğer bileşiklerden etkilenmesine bağlanmaktadır. Mikroorganizma tarafından kısa sürede enzim üretiminin gerçekleştirilmesi önemli avantaj sağlamaktadır. Bu parametrelerle üretilen besiyerinde proteaz aktivitesi 60.79 U/mL olarak hesaplanmıştır. Literatürdeki benzer çalışmalara bakıldığında Paranthaman ve ark. [10], *A.niger* bakterisi kullanarak pirinç atıklarından proteaz enzimi üretiminde aktiviteyi 67.7 U/g bulurken, Devi ve ark. [11] da *A. niger* küfö ile yaptıkları optimizasyon çalışmalarında proteaz aktivitesini 89.1 U/mL olarak belirtmişlerdir. Çalışmamızdan elde edilen değer ile yakın sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 1. Sinyal gürültü oranları için tepki tablosu (daha büyük olan daha iyidir)
 Figure 1. Response table for signal-to-noise ratios (the larger, the better)



Şekil 2. Taguchi deney tasarımıyla enzim üretiminin sinyal/gürültü oranı sonuçları
 Figure 2. Results of the signal-to-noise ratio for enzyme production in the Taguchi experimental design

Çalışmada proteaz üretimini etkileyen faktörlerden biri besiyerinde bulunan protein çeşidi olmuştur. Proteinler aminoasitlerin polimerleşmesi sonucu oluşan polimerlerdir ve her aminoasidin miktarı ve türü protein kaynağına göre farklılık gösterir. Örneğin hayvansal ve bitkisel proteinlerin de içerdikleri aminoasitler farklıdır ve bu aminoasit farklılıkları proteaz çeşidini de etkiler. Proteazlar aktif bölgelerindeki fonksiyonel aminoasit köküne göre serin proteaz, sistein proteaz, asidik proteaz ve metalloproteazlar olarak sınıflandırılmaktadır. Çalışmamızda hazırlanan besiyerinin bileşiminde bulunan bitkisel proteinlerden bakliyatlar, asidik asit, lizin, glutamik asit ve arjinin gibi aminoasitleri içerir. Hayvansal proteinler proteazın proteini parçalamak için kullandığı enzimlerden sistein ve serin dahil 20 aminoasidin tamamını içerir [12]. Proteaz üretimi için hayvansal proteinler bitkisel proteinlere kıyasla aminoasit açısından daha zengin olmasına rağmen, bitkisel ve hayvansal proteinin eşit miktarda olduğu besiyeri proteaz üretimi için en uygun besiyeri olarak belirlenmiştir. Literatürdeki protein farklılığı üzerine yapılan bir çalışmada Pinar ve ark. [13], pirinç çeşitlerinin farklı coğrafi bölgelerde yetiştirildiği için numunelerdeki protein seviyesinin oldukça farklı olduğunu raporlamıştır. Çeşitli pirinç atığı örneklerinden

ekstrakte edilen proteazların aktivitelerini karşılaştırmış ve farklı pirinç numunelerindeki proteaz üretim seviyesindeki farkın, numunelerin protein içeriğindeki farktan kaynaklandığını belirtmiştir. İnkübasyon süresinin etkisi yapılan çalışmalarda incelendiğinde; Upgade ve ark. [14], Fransız fasulyesi kullanarak gerçekleştirdiği fermantasyonda; Qazı ve ark. [15] ise buğday kepeği ve soya fasulyesinden proteaz üretimini, çalışmamızdan farklı olarak optimum 48. saatte elde etmiştir ve bunun yanı sıra Shivakumar [16] yaptığı benzer çalışmada optimal inkübasyon süresinin 120. saatte 280 U/g enzim aktivitesi ile elde ettiğini belirtmiştir. Fakat tüm çalışmalar verimin artan inkübasyon süresince düştüğü yönünde ortak bir karara varmıştır.

Çalışmada optimum enzim üretimi besiyerinin pH'sı 5.5 olduğunda gözlenmiştir. Bunun yanı sıra benzer çalışmalarda da farklı sonuçlar alınmıştır. Örneğin, Oyeleke ve ark. [5] bitkisel proteinlerden fasulyeyi kullanarak hazırladıkları besiyerinde *A. niger*'den proteaz üretimi için optimum pH'ın 6 olduğunu belirtirken; Shivakumar [16], *Aspergillus sp.* tarafından asit proteaz üretimi için optimum pH'ın 5.0 olduğunu ve 5.0'ın altındaki ve üzerindeki pH'ın enzim üretimini

olumsuz etkilediğini belirtmiştir. Benzer şekilde Oyewole ve ark. [17], mezbaha atıklarından elde ettikleri proteaz enzim aktivitesi için sırasıyla *A. niger* ve *P. frequesans* için 5.0 ve 6.0 pH değerlerinin optimum olduğunu kaydetmiştir. Optimum enzim üretimi için pH'nın mikroorganizma türüne, besiyeri bileşimine ve çalışma koşullarına bağlı olarak 5 ile 6 arasında değiştiği söylenebilir.

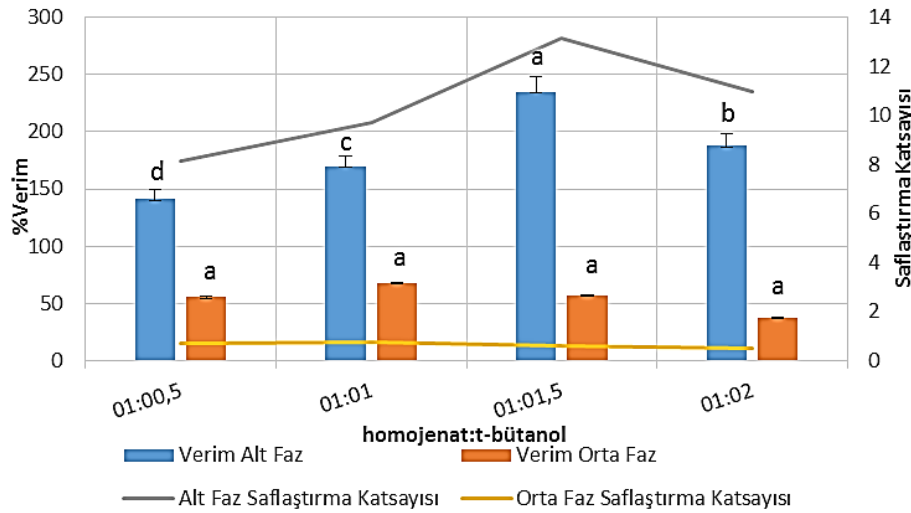
Proteaz Enziminin TPP Sistemiyle Organik Çözgen ve Amonyum Sülfat Oranının İncelenmesi

A. niger'den üretilen proteaz enziminin sırasıyla %30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 konsantrasyonlardaki amonyum sülfat oranları ve 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5 ve 1.0:1.2 gibi değişik homojenat:t-bütanol oranları ile yapılan analizler sonrası bulunan verilerle, yüzde verim ve saflaştırma katsayıları hesaplanmıştır. Saflaştırılan proteaz enziminin, %80 (w/v) amonyum sülfat ve 1.0:1.5 (v/v) homojenat: t-bütanol oranında, alt fazda en iyi % verim ve saflaştırma katsayısını elde ettiği tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 3, Şekil 3). En yüksek enzim verimi ve saflaştırma katsayısı sırasıyla %235.2 ve 13.15 olarak raporlanmıştır.

Tablo 3. *A. niger*'den proteaz enzimi saflaştırma süreci ve aktivite analizi değerleri (n=3, ortalama $\pm$ SS)

Table 3. The protease enzyme purification process from *A. niger* and enzyme activity values (n=3, mean $\pm$ SD)

Faz	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	%Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	2.00	25.85 $\pm$ 3.2	5.20 $\pm$ 1.4	51.70 $\pm$ 4.5	10.40 $\pm$ 2.3	4.97 $\pm$ 2.1	100.00 $\pm$ 0	100.00 $\pm$ 0
Alt faz	2.00	60.79 $\pm$ 7.8	0.93 $\pm$ 0.1	121.58 $\pm$ 9.6	1.86 $\pm$ 0.4	65.37 $\pm$ 6.9	235.17 $\pm$ 12.5	13.15 $\pm$ 5.6
Ara faz	2.00	14.70 $\pm$ 2.3	4.90 $\pm$ 1.3	29.40 $\pm$ 6.5	9.80 $\pm$ 1.7	3.00 $\pm$ 0.8	56.86 $\pm$ 6.9	0.12 $\pm$ 0.1



Şekil 3. Homojenat:t-Bütanol oranlarının proteaz enziminin verim ve saflaştırma katsayısına etkisi. Aynı harfle belirtilen bloklardaki ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ($p\geq 0.05$).

Figure 3. The effect of homogenate-to-t-butanol ratios on the yield and purification factor of the protease enzyme. The differences between the means in bars marked with the same letter are insignificant ($p\geq 0.05$).

Literatürdeki saflaştırma çalışmalarında çoğunlukla çok aşamalı kromatografik yöntemler tercih edilir fakat TPP yöntemiyle saflaştırmaya ait az sayıda çalışma vardır. TPP yöntemi kullanılarak yapılan saflaştırmalarda genellikle %25-363 arası verim ve 2.7-95 arası saflaştırma katsayısına ait sonuçların bildirildiği gözlenmiştir [1]. *Calotropis procera* ve *Cucumis melo* (*Cucumis*)'nun TPP yöntemiyle proteaz saflaştırması üzerine yapmış olduğu çalışmalarda %60-65 amonyum sülfat konsantrasyonunda, yüksek oranda enzim geri kazanımı ve saflaştırma tespit edilirken, t-bütanol hacmindeki artışın, enzim aktivitesinde bir azalmaya sebep olduğu belirtilmiştir [2]. Pinjara ve ark. [13] *A. niger* ve *A. flavus* proteazlarını %70 doygunlukta

amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz ile sırasıyla 11 ve 9 kat saflaştırmıştır. Chimbekujwo ve ark. [18] *A. brasiliensis* BCW2 tarafından üretilen ham proteazı, amonyum sülfat (%80) kullanılarak kısmen saflaştırılmış ve %28 proteaz geri kazanımı ile 13.3 kat saflık vermiştir. Rüzgar'ın *B. licheniformis* OSB6'dan proteaz enzimlerinin TPP ile saflaştırılması üzerine yaptığı çalışmada %70 amonyum sülfat ve 1.0:1.5 t-bütanol oranıyla saflaştırmayı gerçekleştirdiği bildirilmiştir [2]. Başka bir çalışmada ipek otundan proteaz enzimini saflaştırmak için ilk olarak 1.0:0.5 homojenat:t-bütanol ve %50 amonyum sülfat oranında ilk TPP yapılmış ve sonrasında alt faz alınarak 1.0:0.5 homojenat:t-bütanol oranında %65 amonyum sülfat ile ikinci bir TPP

yapılmıştır. Analiz sonucunda enzimin %132 verim ve 6.92 kat saflaştırıldığı ve enzimin alt fazdan elde edildiği tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada balık iç organlarında alkalın proteazı saflaştırmak amacıyla 1.0:0.5 oranında t-bütanol, %50 amonyum sülfat kullanılarak pH 8.0' de TPP yöntemi uygulanmış ve enzimin %154 verimle saflaştırıldığı bildirilmiştir. Sonuç olarak t-bütanol miktarı daha düşük olduğunda amonyum sülfat ile yeterli sinerji oluşturamaz ama daha yüksek ise protein denatürasyonuna neden olması kaçınılmazdır. Ayrıca yapılan çalışmalarda TPP prosedürleri sırasında amonyum sülfat konsantrasyonundaki artışın enzimlerin aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir [2].

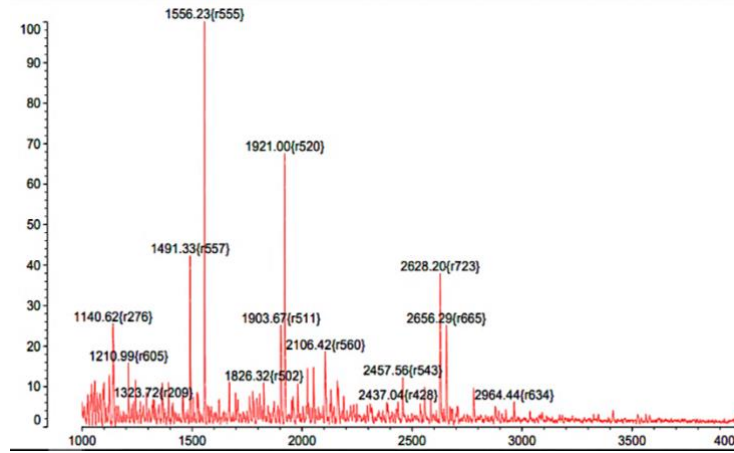
Moleküler Ağırlığın Belirlenmesi

Bu çalışmada, *A. niger* tarafından üretilen proteaz enziminin moleküler ağırlığı, MALDI-TOF kütle spektrometresi kullanılarak belirlenmiştir. Spektrum analizi sonucunda, en belirgin pik 1556.23 Da bölgesinde gözlemlenmiştir. Bu sonuç, proteaz enziminin yaklaşık 15.56 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu göstermektedir.

Elde edilen moleküler ağırlık, literatürde yer alan diğer *Aspergillus* türlerinden izole edilen alkali proteazlarla kıyaslandığında benzerlik göstermektedir. Örneğin, farklı mikroorganizmalardan üretilen proteaz enzimlerinin moleküler ağırlıklarının genellikle 10-45 kDa aralığında olduğu bilinmektedir [19]. Bu bağlamda, çalışmamızdaki enzim, düşük moleküler ağırlıklı proteazlar sınıfına girmektedir.

Bununla birlikte, grafikte gözlemlenen diğer pikler, enzimdeki olası post-translasyonel modifikasyonlar, fragmentasyon veya saflaştırma yöntemine bağlı olarak küçük peptit kontaminasyonlarıyla ilişkilendirilebilir. Ayrıca, 1921.00 Da ve 2106.42 Da bölgelerinde görülen sinyaller, enzim yapısında bulunan olası alt birimlere veya parçalanmış protein formlarına işaret edebilir.

Sonuç olarak, MALDI-TOF analizi ile belirlenen 15.56 kDa moleküler ağırlık, proteaz enziminin karakterizasyonuna önemli bir katkı sağlamaktadır. Bu enzim, özellikle deterjan, deri işleme ve gıda endüstrisinde kullanım potansiyeli olan alkali proteazlarla benzer özellikler göstermektedir [11]. Gelecekte, daha ileri saflaştırma teknikleri ve kristalografi çalışmaları ile enzimin yapısal ve fonksiyonel özellikleri daha ayrıntılı olarak incelenebilir.



Şekil 4. Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı
Figure 4. The molecular weight of the purified enzyme

Proteaz Enzimi Üzerine Optimum Şartlarının Tespitine Yönelik Sonuçlar

Saflaştırılan proteaz enziminin pH 10.0 glisin-NaOH (pH 9.0-11.0) tamponunda optimum aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4). Benzer şekilde Devi ve ark.'nın [11], *A. niger* ile yaptıkları optimizasyon çalışmalarında ve Lanka ve ark.'nın [6] süt ürünleri atık suyunda alkalın proteaz üretiminde de optimum pH'nın 10.0 olduğunu bulmuştur. Bununla birlikte, Coral ve ark.'nın [20], yanı sıra Oyeleke ve ark. da [5] *A. niger*'den proteaz aktivitesi için optimum pH'nın 9.0 olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmaların aksine Olajuyigbe ve Ajele [21] *A. niger*'den asit proteaz üretiminde pH kararlılığının pH 3.5'te en iyi olduğunu ve 4.0'dan sonra hızla düştüğünü belirtmiştir fakat *A. niger* ile yapılan çalışmaların çoğunda optimum pH 10.0 olarak bulunmuştur. Çalışmalar karşılaştırıldığında elde edilen

enzimin pH kararlılığının oldukça iyi olduğu ve literatürdeki çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, optimum pH'nın 10.0 olarak bulunması, enzimin alkali şartlarda da aktif olduğunu göstermektedir.

Sıcaklık çalışmaları sonucunda proteazın en iyi aktiviteyi 60°C'de 1 saatlik inkübasyon süresinin ardından %98.91'lik değer ile sağladığı görülmüş ve diğer sıcaklık değerleriyle karşılaştırıldığında değişen sürelerde aktivitesini en iyi koruyan sıcaklık olduğu gözlenmiştir. Qazi ve ark.'nın [15] yaptığı benzer bir çalışmada da buğday kepeği ve soya fasulyesini kullanarak *A. niger*'den proteaz üretimi için optimum sıcaklığın 60°C olduğunu buldukları gibi başka çalışmalarda yine *A. niger* kullanılarak üretilen proteazın 40 ile 50°C'de optimum aktivite sergilediği gösterilmiştir. Literatürde çoğunlukla sıcaklık ve inkübasyon süresi arttıkça

aktivitenin düştüğü görülür fakat termofilik enzimlerin genellikle sıcaklık sonucu aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Endüstriyel çalışmalarda sıcaklığa dayanıklılık ve yüksek alkalilik olması istenen bir durumdur ve enzimin tercih edilme sebepleri arasında yer alır. Biyoteknolojik uygulamalar ve biyomühendislik

alanlarında da yüksek pH ve yüksek sıcaklık aralığında aktivitesini ve stabilitesini yüksek tutan proteazlar ve daha fazla kullanılır [2]. Dolayısıyla bu yönüyle *A.niger*'den üretilen proteaz enziminin oldukça avantajlı olduğu söylenebilir.

Tablo 4. pH değerinin ve sıcaklığın proteaz enziminin yüzde bağıl aktivitesine etkisi (n=3, ortalama $\pm$ SS)
Table 4. The effect of pH and temperature on the percentage relative activity of the protease enzyme (n=3, mean $\pm$ SD)

pH						
6	7	8	9	10	11	
85.2±5.6	82.2±7.3	78.2±4.2	75.2±2.5	100.0±0.0	54.5±6.3	
Sıcaklık (°C)						
20	30	40	50	60	70	80
80.7±4.5	89.3±3.9	88.0±9.2	91.6±4.3	100.0±0.0	96.0±3.4	81.47±3.9
						71.5±5.7

Saflaştırılan proteaz enzimi üzerine okside edici ajan olan H₂O₂'nin ve yüzey aktif maddelerin etkisi incelendiğinde; %1 konsantrasyondaki SDS enzim aktivitesinde ciddi bir aktivite kaybına sebep olurken, %5'lik SDS' in enzimin aktivitesini tamamen inhibe ettiği tespit edilmiştir (Tablo 5). Yüzde 1'lik H₂O₂'nin ise enzimin aktivitesini %87'ye kadar koruduğu görülmüştür. Sonuç olarak yüzey maddelerinin konsantrasyonunun artmasının enzim aktivitesine olan etkinin de artmasına neden olduğu belirlenmiştir. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında; Sattar ve ark. [22] *A. niger* kaynaklı proteaz aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerin, metal

iyonlarının ve çözücülerin etkisini incelediği çalışmada 30 dakikalık inkübasyon sonrasında Tween 80 ve Trion X-100' ün yaklaşık %25 inhibisyona sebep olduğu, SDS varlığında enzimin %50 oranında aktivitesini kaybettiğini bildirmiştir. Benzer şekilde Pham ve ark. [23] *A. niger* VTCC-F021'den ürettikleri proteaz aktivitesinin %0.5–%2 (w/v) konsantrasyonlarda Tween 80 ve Tween 20' ye karşı yüksek direnç gösterdiğini ve başlangıç aktivitesinin %80'inden fazlasını koruduğunu tespit etmiştir. SDS ve Triton X-100 ise enzim aktivitesini üçte iki oranında azaltmıştır.

Tablo 5. Yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi (n=3, ortalama $\pm$ SS) üzerine etkisi
Table 5. The effect of surfactants and oxidizing agents on the activity of the purified protease enzyme (n=3, mean $\pm$ SD)

Yüzey Aktif Maddeler	%1	%5
Kontrol	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
SDS	9.23 $\pm$ 2.40	0.00 $\pm$ 0.00
Tween-20	43.24 $\pm$ 2.50	28.12 $\pm$ 3.70
Tween-80	57.32 $\pm$ 4.50	37.51 $\pm$ 4.30
TritonX-100	50.32 $\pm$ 3.40	25.17 $\pm$ 2.80
H2O2	87.32 $\pm$ 5.40	63.77 $\pm$ 6.40

Proteaz enzimine inhibitörlerin etkisini incelendiğinde %1 PMSF varlığında aktivitesinin yaklaşık %95'ini inhibe ettiği, %5 konsantrasyonda ise neredeyse tamamını inhibe ettiği görülmektedir (Tablo 6). Serin spesifik inhibitörü olan PMSF'nin enzimin üzerindeki inhibe etkisi aktif bölgesinde bir serin proteaz olduğunu ve enzimin alkalın serin proteaz olduğunu göstermektedir. Enzim

aktivitesinin EDTA varlığında da azalması enzimin metal bağlama bölgesine sahip olduğunu göstermektedir. Basu ve ark.'nın [24] yaptığı benzer karakterizasyon çalışmalarında, *A. niger* tarafından üretilen proteazın EDTA varlığında %90 inhibe olduğu ve PMSF tarafından aktif bölgedeki temel serin kalıntısının ve aktivitenin tamamen kaybolmasına neden olduğu görülmüştür.

Tablo 6. İnhibisyon çözeltilerinin proteaz aktivitesi üzerine etkisi (n=3, ortalama $\pm$ SS)
Table 6. The effect of inhibition solutions on protease activity (n=3, mean $\pm$ SD)

İnhibisyon çözeltileri	Konsantrasyon (mM)	Kalan aktivite (%)
Kontrol	0	100.00 $\pm$ 0.00
β-merkaptotanol	1	41.32 $\pm$ 3.20
	5	23.45 $\pm$ 1.60
EDTA	1	58.12 $\pm$ 5.40
	5	29.68 $\pm$ 2.30
PMSF	1	4.85 $\pm$ 0.90
	5	1.23 $\pm$ 0.20
DTNB	1	75.11 $\pm$ 5.30
	5	60.23 $\pm$ 3.80
Üre	1	48.41 $\pm$ 3.10
	8	31.57 $\pm$ 2.70

Proteaz enziminin farklı substratlardaki aktivite miktarı incelendiğinde enzimin en iyi kazein varlığında aktivite gösterdiği ve kazeini sırasıyla azokazein, hemoglobin, jelatin ve en son olarak da BSA'nın takip ettiği görülmektedir (Tablo 7). Muazu'nun [25] *A. niger* üzerine yaptığı çalışmada da kazeinin substrat olarak etkisi çalışılmış ve 0.44 µg/mL ile en yüksek proteaz aktivitesi kazeinde elde edilmiştir. Benzer olarak Leng ve ark. [26] *A. oryzae* CH93'den saflaştırılan proteaz enziminin BSA, jelatin, kazein ve azokazein substratları varlığında

aktivitesi incelendiğinde kazeinin en iyi aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir. Çeşitli substratlara enzimin ilgisinin olması kullanım alanlarının genişlemesine olanak sağlar. Bu nedenle bazı belli koşullar altında stabil kalabilen enzimler, stabilitenin moleküler temelini anlamak adına bir model sistem oluşturur ve bu durum endüstriyel uygulamalar için proteazların tasarlanmasına öncülük edebilir [27-28].

Tablo 7. Proteaz enziminin doğal substratlara (%0.6, w/v) karşı yüzde bağıl aktivitesi (n=3, ortalama ± SS)

Table 7. Percent relative activity of the protease enzyme against natural substrates (0.6%, w/v) (n=3, mean ± SD)

Kazein	Azokazein	Hemoglobin	Jelatin	BSA
100	83.6±4.6	47.3±3.2	35.4±3.8	21.2±1.9

SONUÇ

Bu çalışma, organik atıklardan elde edilen besiyerlerinde *A. niger* kullanılarak proteaz enzimi üretimini, saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu kapsamlı bir şekilde incelemiştir. Elde edilen sonuçlar, organik atıkların enzim üretimi için uygun ve ekonomik bir substrat olabileceğini göstermektedir. Taguchi deney tasarımına göre optimize edilen besiyeri koşullarında (%50 hayvansal-%50 bitkisel protein, pH 5.5, 24 saat inkübasyon süresi), en yüksek proteaz üretimi gözlemlenmiştir.

Üçlü faz ayırma yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen saflaştırma sürecinde, %80 amonyum sülfat ve 1.0:1.5 (v/v) homojenat:t-bütanol oranında %235.7 verimle 13.15 kat saflaştırma sağlanmıştır. Saflaştırılan proteaz enziminin moleküler ağırlığı 15.56 kDa olarak belirlenmiştir. Optimum pH değeri 10.0, optimum sıcaklık değeri ise 60°C olarak tespit edilmiş olup, enzim yüksek sıcaklık ve alkalik koşullara dayanıklılık göstermiştir.

Bununla birlikte, enzim aktivitesi okside edici ajanlar, yüzey aktif maddeler ve inhibitörlerin varlığında değişkenlik göstermiştir. Özellikle SDS ve PMSF gibi inhibitörlerin enzim aktivitesini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Substrat spesifikliği açısından ise en yüksek aktivitenin kazein varlığında gerçekleştiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamız, atık değerlendirme ve biyoteknolojik enzim üretimi alanlarında sürdürülebilir ve ekonomik bir yaklaşım sunmaktadır. Endüstride proteaz enzimlerinin kullanım alanlarını genişletmek ve üretim süreçlerini daha verimli hale getirmek amacıyla, organik atık bazlı üretim süreçlerinin geliştirilmesi önemli bir adım olacaktır.

TEŞEKKÜR

Arş. Gör. Dr. Alev Akçay'a çalışmaya yardımlarından dolayı teşekkür ederiz.

ORTAK ÇIKAR BEYANI/ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir ortak çıkar beyanı ya da çıkar çatışması beyan etmemiştir.

YAZARLARIN KATKISI

Çalışmaya yazarların eşit oranda katkısı olmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Tolan, M. (2015). Mikrobiyal Kökenli Proteaz Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Tokat.
- [2] Rüzgar, D. (2019). *Bacillus licheniformis* OSBS 6'dan Amilaz ve Proteaz Enzimlerinin Üçlü Faz Ayırma Sistemi (TPP) ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Erzurum.
- [3] Duman, Y. (2016). Üçlü faz ayırımı (ÜFA) ile geleneksel enzim saflaştırma tekniğinin karşılaştırılması; ÜFA ile saflaştırılan β-galaktosidazın termodinamik özellikleri. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(3), 107-117.
- [4] Madhumithah, C.G., Krithiga, R., Sundaram, S., Sasikumar, C.S., Guhathakurta, S., K.M. Cherian, K.M. (2011). Utilization of vegetable wastes for production of protease by solid state fermentation using *Aspergillus niger*. *World Journal of Agricultural Science*, 7(5), 550-555.
- [5] Oyeleke, S.B., Oyewole, O.A., Ekwim, E.C. (2011). Production of protease and amylase from *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* using *Parkia biglobosa* (Africa Locust Beans) as substrate in solid state fermentation. *Advances in Life Science*, 1(2), 49-53.
- [6] Lanka, S. Anjali, C.H., Pydipalli, M. (2017). Enhanced production of alkaline protease by *Aspergillus niger* DEF 1 isolated from dairy form effluent and determination of its fibrinolytic ability. *African Journal of Microbiology Research*, 11(11), 440-449.

- [7] Gagaoua, M., Equipe, K.H. (2013). Three phase partitioning system, an emerging non-chromatographic tool for proteolytic enzymes recovery and purification. *Biosensors Journal*, 5(1), 1-4.
- [8] Gurung, N., Ray, S., Bose, S., Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 18(1), 1-19.
- [9] Gupta, R., Beg, Q., Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 15- 32.
- [10] Paranthaman, R., Alagusundaram, K., Indhumathi, J. (2009). Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World Journal of Agricultural Science*, 5(3), 308-312.
- [11] Devi, M.K., Banu, A.R., Gnanaprabhal, G.R., Pradeep, B.V., Palaniswamy, M. (2008). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Technology*, 1(7), 1-6.
- [12] Çetiner, M.E., Bilek, S. (2018). Protein kaynakları. *Çukurova Tarım Gıda Bilim Dergisi*, 33(2), 111-126.
- [13] Sankeerthana, C., Pinjar, S., Jambagi, S., Bhavimani, R.T., Anupama, S., Sarovar, B.S., Inamdar, S.R. (2013) Production and partial characterization of protease from *aspergillus flavus* using rice mill waste as a substrate and its comparison with *Aspergillus niger* protease. *International Journal of Current Engineering Technology*, 1, 143-147.
- [14] Upgade, A., Nandeshwar, A., Samant, L. (2011). Assessment of fungal protease enzyme from French bean using *A. niger* by solid state fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(4), 45-51. A. Upgade,
- [15] Qazi, J.I., Jamshaid, H., Nadeem, M., Ali S.S. (2008). Production of proteases by *Aspergillus niger* through solid state fermentation. *Punjab University Journal of Zoology*, 23(1-2), 037-046.
- [16] Shivakumar, S. (2012). Production and characterization of an acid protease from a local *Aspergillus* sp. by Solid substrate fermentation. *Archives of Applied Science Research*, 4(1), 188-199.
- [17] Oyewole, O.A., Oyeleke, S.B., Dauda, B.E.N., Emiade, S. (2011). Production of amylase and protease enzymes by *Aspergillus niger* and *Penicillium frequestans* isolated from abattoir effluent. *Microbiology Journal*, 1(5), 174-180.
- [18] Chimbekujwo, K.I., Ja'afaru, M.I., Adeyemo, O.M. (2020). Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. *Scientific African*, 8(1), 2-9.
- [19] Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.
- [20] Coral, G., Arian, B., Unaldi, M.N., Guvenmez, H. (2003). Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of Microbiology*, 53(4), 491-498.
- [21] Olajuyigbe, F.M. (2006). Influence of media composition on acid protease production by *Aspergillus niger* (NRRL 1785). *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 12(1), 85-88.
- [22] Sattar, H., Aman, A., Qader, S.A.U. (2017). Effect of metal ions, solvents and surfactants on the activity of protease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 13, 491-495.
- [23] Pham, T. H., Quyen, D.T., Nghiem, N.M. (2012). Purification and properties of an endoglucanase from *Aspergillus niger* VTCC-F021. *Turkish Journal of Biology*, 36(6), 694-701.
- [24] Basu, B. R., Banik, A.K., Das, M. (2008). Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB 100 grown on fish scale. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 449-455.
- [25] Muazu, A. (2015). Production and characterization of extracellular protease enzyme from *Aspergillus niger* using different agro-industrial residues. *International Journal of Science and Technology*, 4(12), 535-541.
- [26] Leng, Y.W., Xu, Y. (2011). Improvement of acid protease production by a mixed culture of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation technique. *African Journal of Biotechnology*, 10(35), 6824-6829.
- [27] Saxena, L., Iyer, B.K., Ananthanarayan, L. (2007). Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/protease inhibitor. *Process Biochemistry*, 42(3), 491-495.
- [28] Konak, Ü. İ., Karakaş, B., Certel, M., Erem, F. (2012). Katı faz fermentasyon yöntemi ile enzim üretimi. *Akademik Gıda*, 10(3), 84-92.