



**GLUTENSİZ GIDA ÜRETİMİ AMAÇLI, PROLİL
ENDOPEPTİDAZ (PEP) ENZİMİNİN ÜRETİLMESİ,
SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

BELMA ŞENOL

DOKTORA TEZİ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Ağustos - 2020

Her hakkı saklıdır

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

GLUTENSİZ GIDA ÜRETİMİ AMAÇLI, PROLİL ENDOPEPTİDAZ (PEP)
ENZİMİNİN ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU

BELMA ŞENOL

TOKAT
Ağustos - 2020

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

**Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
Başkanlığı tarafından 2018/32 nolu proje ile desteklenmiştir.**

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

BELMA ŞENOL

25 Ağustos 2020

ÖZET

DOKTORA TEZİ

GLUTENSİZ GIDA ÜRETİMİ AMAÇLI, PROLİL ENDOPEPTİDAZ (PEP) ENZİMİNİN ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU BELMA ŞENOL

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İSA GÖKÇE)

Gluten, tahıllar olarak bilinen buğday, arpa, çavdar ve yulafta bulunan bir protein grubudur. Bu bitkisel proteinin vücuda alınması ile ince bağırsakta emilim bozukluğunun ön planda olduğu, sistemik bir hastalık olan çölyak hastalığı meydana gelmektedir. Gluten içeren yiyeceklerin diyetle eklenmesi ile birlikte; kusma, yağlı ishal, kilo alamama ve karın şişliği gibi bulgular gözlenmektedir. Glutensiz diyet, çölyak hastalığının tek tedavisidir. Günümüzde, glutenin toksik olmayan fragmanlara parçalanmasını sağlamak amacıyla bakteriyel ve fungal oligopeptidazların kullanılması da umut vadeden alternatif bir tedavi olarak değerlendirilmektedir. *Aspergillus niger*'den elde edilen Prolil Endopeptidaz (PEP) enzimi gluteni tümüyle sindiren bir enzimdir.

Bu çalışmada Prolil Endopeptidaz (PEP) enziminin pET22b vektörü kullanılarak *E.coli* ekspresyon sisteminde rekombinant olarak üretilmesi hedeflenmiştir. Ekspresyon suşu olarak *E. coli* BL21 (DE3) pLysE hücreleri kullanılmıştır. İnklüzyon cisimciği oluşumu gözlenen PEP enziminin yeniden katlanması sağlanmış ve PEP proteini afinite kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PEP enzimi gluten ve sentetik substrat (benziloksikarbonil-glisin-prolin-p-nitroanilid) kullanılarak aktivite testi yapılmıştır. Sonuçta, rekombinant olarak üretilen PEP enzimi 280 mg/L verim ile elde edilmiş ve gluteni parçaladığı tespit edilmiştir. Üretilen PEP enzim pH 6 da optimum aktivite göstermiş olup, optimum sıcaklığı da 30°C olarak bulunmuştur.

2020, 87 SAYFA

ANAHTAR KELİMELELER: Gluten, Prolil Endopeptidaz (PEP), Çölyak, *Aspergillus niger*, *E. coli*, Rekombinant enzim.

ABSTRACT

PhD. THESIS

PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROLYL ENDOPEPTIDASE (PEP) ENZYME, FOR GLUTEN FREE FOOD PRODUCTION

BELMA ŞENOL

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

(SUPERVISOR:)PROF. DR. İSA GÖKÇE

Gluten is a group of protein found in wheat, barley, rye and oats known as grains. Celiac is a systemic disease in which malabsorption in the small intestine is at the forefront and occurs with the intake of these vegetable proteins into the body. With the addition of gluten-containing foods to the diet, symptoms such as vomiting, fatty diarrhea, inability to gain weight and abdominal distension are observed. Gluten-free diet is the only treatment for celiac disease. Today, the use of bacterial and fungal oligopeptidases that break down gluten into non-toxic fragments is considered as a promising alternative therapy. Prolyl Endopeptidase (PEP) enzyme obtained from *Aspergillus niger* is an enzyme that completely digests gluten.

In this study, it was aimed to produce recombinant *A. niger* Prolyl Endopeptidase (PEP) enzyme in *E. coli* expression system using the pET22b vector. *E. coli* BL21 (DE3) pLysE cells were used as the expression strain. The PEP enzyme, which was observed in a form of inclusion bodies, then it was refolded and the PEP protein was purified by affinity column chromatography. The activity test of the purified PEP enzyme was performed using gluten and benzyloxycarbonyl-glycine-proline-p-nitroanilide that is a synthetic substrate. As a result, produced PEP enzyme was obtained at a yield of 280 mg / L and it was capable to digest gluten. The PEP enzyme demonstrated its optimum activity at pH 6 and its optimum temperature was 30°C.

2020, 87 PAGES

KEYWORDS: Gluten, Prolyl EndoPeptidase (PEP), Celiac, *Aspergillus niger*, *E. coli*, Recombinant enzyme.

ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanmasında, araştırmalarımnda kendimi geliştirme olanağı sağlayan, çalışmanın yürütülmesi boyunca laboratuvarlarının tüm imkânlarını kullanmama izin veren, her konuda bilgi ve tecrübesiyle yardımcı olan, büyük emekleri geçen danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye,

Laboratuvardaki deneysel aşamalar esnasında, yardımlarını esirgemeyen tecrübe ve önerilerinden yararlandığım Arş. Gör. Özlem KAPLAN, Arş. Gör. Rizvan İMAMOĞLU, Arş. Gör. Dr. Hülya KUDUĞ ve Arş. Gör. Dr. Sema BİLGİN'e,

Doktora tezimi, 2018/32 numaralı proje ile destekleyen Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na,

Teşekkürü bir borç bilirim.

Tezin tüm süreçlerinde, bana yaptığı her türlü fedakârlıkla destek olan dostum Doç.Dr. İlkay Noyan Yalman'a, arkadaşım Deniz Yılmaz'a, her aşamada yanımda olup, desteklerini esirgemeyen annem ve babama, kardeşlerim Melda ve Murat'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Belma ŞENOL

25 Ağustos 2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER	4
2.1. Enzimler	4
2.2. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Enzimler.....	7
2.3. Çölyak Hastalığı	17
2.3.1. Giriş	17
2.3.2. Mekanizma ve tanı	17
2.3.3. Klinik bulgular	24
2.3.4. Gluten proteinlerinin toksik fragmanları (çölyak hastalığından sorumlu peptitler).....	26
2.3.5. Glutensiz diyet ve ürün pazarı	27
2.3.6. Yeni terapiler	30
2.4. Gluten	31
2.5. Pep Enzimi.....	33
2.5.1. Pep enzim uygulamaları	36
2.6. Rekombinant DNA Teknolojisi	39
2.6.1. Rekombinant DNA teknolojisinin temelleri	39
2.6.2. Hedef DNA'nın (veya RNA) elde edilmesi.....	39
2.6.3. Hedef genin PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltılması.....	40
2.6.4. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim	40
2.6.5. Gen DNA'sının vektör DNA'sı ile birleştirilmesi (ligasyon).....	41
2.6.6. Oluşan rekombinant vektör DNA'nın alıcı hücreye aktarılması	42
2.6.7. Seleksiyon.....	42
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	43
3.1. Materyal.....	43
3.1.1. Donanımlar	43
3.1.2. Kimyasallar	44
3.1.3. Çözeltiler.....	46
3.2. Yöntem	50
3.2.1. Proteini kodlayan genin nükleotid dizisinin tasarımı	50
3.2.2. Pep geninin vektörlere klonlanması ve sentezi	52
3.2.3. Pep genini içeren plazmitin çoğaltılması.....	53

Plazmit DNA saflaştırılması.....	54
3.3. PEP Enziminin Üretilmesi (İndükleme).....	55
3.3.1. FSB'li kompetent hücre hazırlanması	56
3.3.2. <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysE hücrelerinin parçalanması.....	57
3.3.3. Pep enzimi için inklüzyon cisimciği oluşumunun azaltılması ve Pep enzimi için refolding (yeniden katlanma)	57
3.3.4. Pep enziminin aktivesinin belirlenmesi	59
3.3.5. Pep aktivitesi üzerine bazı parametrelerin etkisi.....	60
4. BULGULAR.....	62
4.1. Pep Enziminin Üretilmesi (İndükleme).....	62
4.2. Pep Enziminde Inklüzyon Cisimciği Oluşumunun Azaltılması	64
4.3. I. Protokolle, Pep Enzimi için Yeniden Katlanma (Refolding) ve Pep Enziminin Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması	64
4.4. II. Protokolle, Pep Enzimi için Yeniden Katlanma (Refolding) ve Pep Enziminin Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması	65
4.5. Pep Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi	67
4.5.1. Pep aktivitesi üzerine bazı parametrelerin etkisi.....	68
4.5.2. pH'nın etkisi.....	68
4.5.3. Sıcaklığın etkisi.....	68
4.5.4. Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi.....	69
4.5.5. Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi	70
TARTIŞMA ve SONUÇ	71
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ.....	87

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
bç	baz çifti
μL	mikro litre
μM	mikro molar
M	Molar
mM	mili molar
nm	nano metre
P	Fosfat
Rpm	Dakikadaki devir sayısı (rotation per minute)

Kısaltmalar	Açıklama
Amp	Ampisilin
AN-PEP	<i>Aspergillus niger</i> Prolil Endopeptidaz
APS	Amonyumpersülfat
BSA	Sığır Serum Albümin
ÇH	Çölyak Hastalığı
ddH ₂ O	Çift saf su (Double distilled water)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosit trifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FSB	Frozen Storage Buffer”
IPTG	İzopropil β-D-1 tiyogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani
OD	Optik dansite
PEP	Prolil endopeptidaz
PCR	Polimeraz zincir (chain) reaksiyonu
PİPES	piperazin-N,N'-bis (2-etanesülfonik asit)
RNA	Ribonükleik asit

PMSF	Fenil metil sülfonil florit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SOB	Super Optimal Broth
TAE	Tris-asetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol



ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Çölyak hastalığında rol oynayan faktörler	18
Şekil 2.2. Çölyak hastalığının farklı dönemlerinde villus yapılarının resimleri	19
Şekil 2.3. Sağlıklı (solda) ve çölyak hastası (sağda) bireylerin bağırsak dokusu	19
Şekil 2.4. Kazanılmış ve doğal immün yanıt mekanizmalarını gösteren çölyak hastalık lezyonu.....	20
Şekil 2.5. Farklı ülkelerde çölyak hastalığı prevalansı.	21
Şekil 2.6. ÇH'nın buzdağı modeli	22
Şekil 2.7. PREP proteininin üç boyutlu yapısı.....	34
Şekil 2.8. Pep enziminin çalışma mekanizması	36
Şekil 2.10. Plazmid kullanarak gen klonlanması ve rekombinant DNA eldesi	39
Şekil 3.1. Pep geni ile birlikte pET22b(+) vektörünün dairesel haritası, pET22b'nin klonlama bölgesinin restriksiyon enzimleri ile birlikte verilen detaylı DNA dizisi	52
Şekil 4.1. pET22b vektör sistemi için indükleme SDS-PAGE görüntüsü.....	62
Şekil 4.2. pET22b vektör sistemi için saflaştırma SDS-PAGE görüntüsü.	63
Şekil 4.3. Yeniden katlanma (refolding) prosesinin SDS-PAGE ile analizi.	64
Şekil 4.4. Kolondan saflaştırma prosesinin SDS-PAGE görüntüsü.....	65
Şekil 4.5. Yeniden katlanma (Refolding) prosesinin SDS-PAGE ile analizi.	66
Şekil 4.6. Kolondan saflaştırma prosesinin SDS-PAGE görüntüsü.....	66
Şekil 4.7. Pep enzim aktivitesinin SDS-PAGE ile analizi.....	67
Şekil 4.8. Pep enzimin pH bağımlılık eğrisi	68
Şekil 4.9. Pep enzimin sıcaklık bağımlılık eğrisi	69
Şekil 4.10. Pep enzimin ısı kararlılık eğrisi	70
Şekil 4.11. Pep enzimi için Linewear-Burk eğrisi	70
Şekil 12. <i>Aspergillus spp.</i> , <i>A. oryzae</i> ve <i>A. niger</i> 'den izole edilen spesifik fungal proteazlar kullanılarak , 60 dakika sonrası SDS-page ile , buğday gliadinlerinin molekül ağırlıklarının tayini ve hidroliz derecesi.	72

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 2.1. Endüstriyel enzimlerin kullanım alanları	5
Çizelge 2.2. Mikrobiyal enzimlerin gıda endüstrisindeki uygulamaları	8
Çizelge 2.3. Çölyak hastaları için, serbest ve yasak olan yiyecekler	29
Çizelge 2.4. Bazı restriksiyon enzimleri.....	41
Çizelge 3.1. <i>A.niger</i> 'e ait Pep proteinine ait optimize edilmiş nükleotid dizisi ve kodladığı aminoasit dizisi	51

Tablo

Sayfa

Tablo 3.1. Donanımlar ve üreticileri	43
Tablo 3.2. Kimyasallar	44

1.GİRİŞ

Enzimatik reaksiyonlar; seçici, hızlı, yüksek verimli ve istenmeyen yan ürün oluşturmama gibi birçok üstün özelliklere sahiptir. Bu özellikleri; gıda, hayvan yemi, biyoyakıt, deterjan, tekstil ve kağıt gibi çeşitli pazarlar için enzimleri önemli araçlar haline getirmektedir. Gıda işlemede kullanılan geleneksel enzimlerin çoğu, doğal ve biyolojik olarak parçalanabilir kabul edilmektedir. Enzimlere olan talep, yıllar içinde istikrarlı bir şekilde artmaktadır. Endüstriyel enzimlerin küresel pazarı 2018 yılına kadar 7 milyar dolara ulaşmıştır ve önümüzdeki yıllarda daha da büyümeye devam etmesi beklenmektedir (Schomburg ve ark., 2013).

Bununla birlikte, mevcut endüstriyel işlemlerin çoğu; aşırı sıcaklık, asitlik/bazlık ve yüksek tuzluluk koşulları nedeniyle geleneksel enzimlerin bütünlüğüne zarar vermektedir. Bu bağlamda, endüstriyel işlem ortamlarına dayanabilecek niteliklere sahip yeni enzimlerin keşfi, biyokatalizin geleceği için çok önemlidir (Schomburg ve ark., 2013).

Gıda endüstrisinde de, birçok ürünlerin elde edilmesinde enzimler önemli rol oynamaktadırlar. Uzun yıllardır, enzimlerin aktivitesi sayesinde, peynir ve ekmek gibi birçok gıdanın üretimi gerçekleşmektedir. Enzimatik reaksiyonlar sonucunda yine, yoğurt ve fermente ürünler de üretilmektedir; fakat bu ürünlerde, mikroorganizmalar, saflaştırılmış enzimlerden daha çok bu reaksiyonların gerçekleşmesini sağlamaktadırlar (Smith ve ark.,1997). *Bacillus*, *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Micrococcus*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Candida*, *Rhizopus*, *Endothia*, *Mucor* ve *Mortierella* cinslerine ait bakteri, küf ve mayalar, enzim üretiminde yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalardır. Endüstriyel enzimlerin çoğu; daha yüksek ekspresyon seviyesine sahip olması veya patojenik organizmalardan kaynaklanan enzimlerin ekspre edilebilmesi, yüksek saflık ve daha ucuz üretim gibi avantajlar dolayısıyla modifiye mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Ayrıca modifiye mikroorganizmalar, enzimlerin endüstriyel işlemlerde kullanım özelliklerinin iyileştirilmesi için protein mühendisliği çalışmalarına da olanak sağlamaktadır (Wiseman, 1987).

Gıda endüstrisinde, enzimlerin %80'i hidroliz amaçlı kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan enzimlerin %60'ını proteazlar, %30'unu karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %7'sini de diğer enzimler oluşturmaktadır. Bunlardan proteolitik enzimler (proteazlar) ise, bira, peynir, soya sosu vb. çeşitli gıdaların üretiminde ve besin ögesi olan proteinlerin enzimatik parçalanmasında önemli rol oynamaktadır. Proteazların başlıca kaynakları; gıda maddesinin kendisi olabileceği gibi, gıdalarda gelişen mikroorganizmalar tarafından da salgılanabilmekte veya izole edilmiş enzim preparatları şeklinde gıdaya ilave edilmektedir. Örneğin, balık sosu üretiminde veya etin olgunlaştırılmasında gıdadaki mevcut enzimler kullanılmaktadır. Peynir üretiminde ise; hem mikroorganizmanın oluşturduğu enzim, hem de enzim preparatları (rennet) etkili olmaktadır. Proteazlardan ekmekçilik endüstrisinde de gıdanın yapısını değiştirme özelliğinden dolayı yararlanılmaktadır. Buğday unundaki depo proteini olan gluteni hidrolize etmekte ve bu sayede hamur viskoelastik bir özellik kazanmaktadır. Böylece, hamurun yoğrulma özelliği iyileşmekte, şekil verilmesi kolaylaşmakta ve ekmek kalitesi de artmaktadır (Tucker ve Woods, 1995).

Çölyak hastalığı da buğday ve benzeri tahıllardaki depo proteini olan glutenin yenilmesiyle ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Gluten proteini, glutamin ve prolin aminoasitleri bakımından oldukça zengindir ve insanın üst gastrointestinal sisteminde zayıf sindirilmektedir. "Gluten" terimi buğdayın bütün protein bileşenini ifade eder; gliadin ise glutenin sadece alkolde çözünen çölyak hastaları için toksik bileşen olan kısmıdır (Shan ve ark., 2002).

Çölyak hastalığı, çocuklarda ve erişkinlerde nüfusun % 1'ine yaklaşan oranlarda görülmektedir (West ve ark., 2003; Bingley ve ark., 2004). Hastalık sadece Avrupa ülkelerinde değil, Orta Doğu, Asya, Güney Amerika ve Kuzey Afrika'da da görülür (Catassi ve ark., 1999; Sood ve ark., 2003; Shahbazkhani ve ark., 2003; Tatar ve ark., 2004). Hastalığın şu anki tek tedavisi ise sadece "glutensiz diyet" tir (Murray ve ark., 2003). Diğer bir yaklaşım da, oral enzim takviyeleri ile gliadinlerin enzimatik hidrolizidir. Bu amaçla oral bir enzim olarak *A. niger* adı verilen küften elde edilen Prolil Endopeptidaz (AN-PEP) tanımlanmıştır. AN-PEP, düşük pH da bile aktivite gösterebilmesinin yanısıra pepsin tarafından sindirime karşıda dirençlidir. Bu sayede, yiyeceklerin midede kaldığı süre içerisinde bile gluten molekülünü

parçalayabilmektedir. AN-PEP enziminin ağızdan alınmasının glutensiz diyetin yerini alamayacağı, ancak ara sıra veya yanlışlıkla gluten alımı olduğunda sindiriminin sağlanacağı yönünde olup, umut verici bir tedavi olarak gündemdedir (Stepniak ve ark. 2006).

Bu tez çalışmasında, modern biyoteknolojik yöntemlerden olan rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak PEP enzimi üretilmiştir. Bu enzim, gluteni tümüyle sindiren bir enzimdir. Üretilen PEP enzimi geni *A. niger* organizmasına aittir. Bu organizmaya ait gen biyoinformatik araçlar kullanılarak belirlenmiş ve kodon optimizasyonu yapılarak Biomatik firmasına sentez ettirilmiştir. pET22b vektörü içerisinde gelen PEP geninin ekspresyonu *E. coli* BL21 (DE3) plySE suşunda gerçekleştirilmiştir. Üretilen PEP proteinin hücrede inklüzyon cisimcikleri şeklinde bulunmasından dolayı, inklüzyon protokolü ile yeniden katlanması sağlanılarak, afinite kolon kromatografisiyle saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin gluteni ve sentetik substratını parçalama etkinliği aktivite testiyle gösterilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimler, kimyasal tepkimelerin hızını artıran biyomoleküllerdir (Smith ve ark., 1997; Garrett ve Grisham, 1999). Enzimlerin çoğu protein yapısında olup, bazı RNA molekülünden olan ribozimler de tepkimeleri katalizlemektedir (Cech, 2000; Lilley, 2005). Enzim tepkimelerinde reaksiyona giren maddelere substrat (reaktan) denir ve enzimler substratı farklı ürünlere dönüştürmektedir. Enzimler tepkimenin aktivasyon enerjisini azaltarak, tepkime hızını artırmaktadırlar. Tepkimelerin dengesini değiştirmez ve katalizledikleri tepkime sonucunda tükenmezler. Fakat enzimler çoğu katalizörden farklı olarak çok daha spesifiktirler. 4000'den fazla biyokimyasal tepkimeyi, enzimlerin katalizlediği bilinmektedir (Bairoch, 2000).

Enzim aktivitesini aktivatörler artırırken, inhibitörler azaltan molekülüdür. pH, basınç, radyasyon, sıcaklık, metal iyonları, ortamın iyonik şiddeti vb. faktörler ile substrat ve enzim konsantrasyonu da enzim aktivitesini etkilemektedir. Günümüzde enzim teknolojisinin hızlı bir şekilde gelişmesiyle enzimler birçok temel alanda kullanılmaya başlanmıştır. Bu alanların başında gelen gıda sanayisinde enzimlerin kullanımına olan ihtiyaç her geçen gün daha da artmaktadır. Li ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada, o gün için yaklaşık olarak 4000 enzimin tanımlanmış olduğunu ve bunlardan sadece 200 tanesinin mikrobiyal orjinli enzimler ve yaklaşık 20 enziminde ticari olarak büyük ölçekte üretilebildiğini belirtmişlerdir. Enzim üretim prosesi, biyokimyası ve fermentasyon işlemlerinin geliştirilmesi sayesinde bu sayılar giderek artmaktadır (Li ve ark., 2013).

Çizelge 2.1. Endüstriyel enzimlerin kullanım alanları (Renugopalakrishnan ve ark., 2005)

Uygulama Alanı	Kullanılan Enzim	Örnekler
Ekmek endüstrisi	Fungal alfa-amilaz enzimler	Undaki nişastanın şekere parçalanmasını katalizler. Mayanın şeker üzerindeki etkisi ile CO ₂ meydana gelir. Ekmek ve ekmek ürünleri yapımında kullanılırlar.
	Proteazlar	Undaki proteaz seviyesini azaltmak için, bisküvi imalatçıları kullanılırlar.
Bebek gıdaları	Tripsin	Bebek gıdalarının önceden sindirimi amacıyla kullanılırlar.
Alkol endüstrisi	Bira üretiminde arpanın ezilmesi ile enzimler salınır.	Nişasta ve proteinleri parçalayarak basit şekerler, aminoasitler ve peptitler üretir, bunlar da fermantasyonda kullanılırlar.
	Arpa enzimlerinin endüstriyel üretimi	Arpadaki doğal enzimler yerine, biracılıkta yaygın olarak kullanılırlar.
	Amilaz, glukanaz, proteazlar	Malttaki polisakkarit ve proteinleri parçalarlar.
	Betaglukanazlar ve arabinoksilanazlar	Arpa bulamacını (wort) ve biranın filtrelene özelliğini iyileştirirler.
	Amiloglukozidaz ve pullulanazlar	Düşük kalorili bira yapımı ve fermantasyonun ayarlanması için kullanılırlar.
	Proteazlar	Biranın saklanması sırasında oluşan bulanıklığın giderilmesini sağlar.
	Asetolaktatdekarboksilaz (ALDC)	Diasetil oluşumunu engeller.
Meyve suları	Selülozlar, pektinazlar	Meyve sularının berraklaştırılması için kullanılırlar.
Süt endüstrisi Rokfor peyniri	Genç geviş getirici hayvanların midesinden elde edilen Rennin	Peynir üretimi, proteinin hidrolizi için kullanılır.
	Mikroorganizmalar tarafından üretilmiş enzimler	Süt endüstrisinde artarak kullanılmaktadır.
	Lipazlar	Mavi küflü rokfor peynirinin üretimi sırasında, peynirin olgunlaşmasında kullanılır.
	Laktazlar	Laktozu, glikoz ve galaktoza parçalar.
Et yumuşatması	Papain	Piştirilecek etin yumuşamasını sağlar.
Nişasta endüstrisi	Amilazlar, amiloglukosidazlar ve glukamilazlar	Niştayı, glikoza ve çeşitli şuruplara dönüştürür.
	Glukoz izomeraz	Niştalı malzemelerden yüksek fruktozlu mısır şurubu üretiminde glikozu fruktoza dönüştürür. Bu şurupların kuvvetli tatlandırıcı özellikleri ve aynı tatlılık derecesi için sükröza kıyasla daha düşük kalori değerleri vardır.

Çizelge 2.1. (Devamı) Endüstriyel olarak kullanılan bazı enzimler (Li ve ark., 2013)

Uygulama Alanı	Kullanılan Enzim	Örnekler
Kağıt endüstrisi	Amilaz Ksilanaz Selüloz Lipaz Ligninazlar	Amilaz, nişastanın viskozitesini düşürerek, kağıdın şekillenmesi ve kaplanmasını kolaylaştırır. Ksilanaz, renk gidermek için kullanılan çamaşır suyu miktarını azaltır. Selüloz lifleri düzgünleştirir, su çekilmesini artırır ve mürekkep giderilmesini kolaylaştırır. Lipazlar, kalınlığı azaltır. Ligninazlar, lignini sindirip kağıdı yumuşatırlar.
Biyoyakıt endüstrisi	Selülozlar	Selülozu, fermente edilebilir şekerlere parçalamak için kullanılır.
	Ligninazlar	Lignin atıkların kullanımını sağlar.
Biyolojik çamaşır tozu	Başlıca proteazlar, bunlar bakteriler tarafından hücre dışına salgılanırlar.	Giysilerden protein lekelerinin çıkarılması için kullanılır.
	Amilazlar	Bulaşık makinası deterjanlarında, dayanıklı nişasta lekelerinin çıkarılmasında kullanılır.
	Lipazlar	Yağ lekelerinin çıkartılmasını kolaylaştırmak için kullanılır.
	Selülozlar	Çamaşır yumuşatıcılarında kullanılır.
Kontakt lens temizleyicileri	Proteazlar	Kontakt lenslerden enfeksiyon olmaması için, proteinleri çıkarmak için kullanılır.
Kauçuk endüstrisi	Katalaz	Peroksitten oksijen üretilerek lateksten sünger, kauçuk imal etmek için kullanılır.
Fotoğraf endüstrisi	Proteaz (fisin)	Artık fotoğraf filmindeki jelatini çözerek içindeki gümüşü elde etmek için kullanılır.
Moleküler biyoloji	Restriksiyon enzimleri, DNA ligaz ve polimerazlar	Gen mühendisliğinde DNA'nın manipülasyonu için, farmakoloji, tarım ve tıpta kullanılır. Restriksiyon sindirimi ve polimeraz zincir reaksiyonu için esastırlar. Moleküler biyolojinin, ayrıca adli tıpta da önemli bir yeri vardır.

2.2. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Enzimler

Enzimler gıda endüstrisinde geleneksel gıda işleme tekniklerine göre daha etkili, güvenli ve çevre dostu alternatifler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ferrer ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada, endüstriyel enzim piyasasının 2017 yılında yaklaşık 6.1 milyar dolar olacağı ve bu rakamın 2022 yılına kadar 8.5 milyar dolara ulaşacağını beklendiğini belirtmişlerdir (Ferrer ve ark., 2016).

Gıda endüstrisi endüstriyel enzim piyasasının büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Gıda endüstrisinde enzimler; süt, fırıncılık, içecek, yağlar, et ve fonksiyonel gıdalar gibi çeşitli yiyeceklerin üretilmesinde kullanılmaktadır. Gıda işlemede kullanılan 55'ten fazla farklı enzim ürünü bulunmaktadır ve yeni gıda enzimlerinin keşfi ile sayı gittikçe artacaktır (Van Oort, 2010). Viskozitenin azaltılması, tattaki değişimler, ekstraksiyonların geliştirilmesi, biyodönüşüm ve sentez gibi pekçok işlem için gıda proseslerinde enzimlerden yararlanılmaktadır. GRAS (Genellikle güvenli olarak kabul edilen) olarak kabul edilmiş kaynaklardan elde edilen enzimlerin, gıda endüstrisinde kullanılması gerekir. Çünkü rekombinant enzim üretiminde kullanılan konakçı mikroorganizmaların toksijenik ve patojenik potansiyelleri oldukça önemlidir (Garrett ve Grisham, 1999). Gıdaların işlenmesinde kullanılan bu rekombinant enzimlerin insan sağlığına olumsuz etki etmemesi gerekmektedir. Bunu sağlamak için de ya fermentasyon koşulları optimize edilerek mikroorganizmanın toksinler gibi sekonder metabolitleri üretmesi engellenmiş ya da çeşitli mutasyon yöntemleri ile organizmanın patojeniteden sorumlu genleri tahrip edilmiştir (Bairoch, 2000).

Mikroorganizmalar eski zamanlardan beri gıda fermentasyonunda ve birçok gıda maddesinin hazırlanmasında fermentasyon aşamalarında kullanılmaktadır (Soccol ve ark., 2005). Gıda endüstrisinde kullanılan mikrobiyal enzimler gıda endüstrisinde önemli bir rol oynarlar. Çünkü bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlerden daha kararlıdır. Fermentasyon teknikleri ile daha az zaman ve alan içerisinde etkin bir maliyetle üretilirler ve yüksek tutarlılıkları nedeniyle proses modifikasyonu ve optimizasyonu çok kolay bir şekilde yapılabilir (Gurung ve ark., 2013). Bu enzimlerin birçoğu gıda, deterjan, kağıt ve tekstil gibi çeşitli endüstriyel sektörlerde çok sayıda uygulama bulmaktadır (Pandey ve ark., 2000). Gıda endüstrisinde, glikoz

şurupları, kristal glikoz, yüksek fruktozlu mısır şurupları ve maltoz şurupları üretiminde kullanılır. Deterjan endüstrisinde nişasta bazlı lekeleri çıkarmak için katkı maddesi olarak, kağıt endüstrisinde ise uygun kağıt kaplaması için nişasta viskozitesinin azaltılmasında, tekstil endüstrisinde de tekstil liflerinin haşılانmasında kullanılır (De Souza ve Magalhães, 2010). Benzer şekilde proteazlar, lipazlar veya ksilanazlar gibi enzimlerinde gıda sektörlerinde geniş uygulama alanları vardır. Çizelge 2.2.'de, mikrobiyal kökenli çeşitli gıda enzimleri hakkında ayrıntılı ve güncel bilgiler verilmiştir.

Çizelge 2.2. Mikrobiyal enzimlerin gıda endüstrisindeki uygulamaları (Raveendran ve ark., 2018)

Mikrobiyal enzim	Uygulama
α -amilaz	Piştirme, mayalama, nişasta sıvılaştırma Ekmek kalitesinin iyileştirilmesi Pirinç kekleri yapımı Meyve suyunun arıtılması
Glukoamilaz	Bira üretimi Ekmek kalitesinin iyileştirilmesi Yüksek glikoz ve yüksek fruktoz şurupları
Proteaz	Bira sanayi Etin yumuşatılması Sütün pıhtılaşması Ekmek kalitesinin iyileştirilmesi
Laktaz (β -galaktosidaz)	İnsanlarda laktoz intoleransının azaltılması Prebiyotik gıda bileşenleri
Lipaz	Peynir lezzet gelişimi Çedar peyniri üretimi
Fosfolipaz	Peynir aroması gelişimi Lipolize süt yağı üretimi

Çizelge 2.2.(Devamı) Mikrobiyal enzimlerin gıda endüstrisindeki uygulamaları
(Raveendran ve ark., 2018)

Mikrobiyal enzim	Uygulama
Esteraz	Meyve suyunda aroma ve kokunun artırılması Diyet lifinin deesterleştirilmesi Kısa zincirli aroma esterlerinin üretimi
Selüloz	Hayvan yemi Meyve suyunun berraklaştırılması
Ksilanaz	Meyve suyunun berraklaştırılması Bira kalitesinin iyileştirilmesi
Pektinaz	Meyve suyunun berraklaştırılması
Glikoz oksidaz	Gıda raf ömrünü uzatma Gıda lezzetini geliştirme
Lakkaz	Şaraptan polifenol uzaklaştırma Pişirme
Katalaz	Gıdaların korunması (glikoz oksidaz ile) Peynir üretiminden önce süttten hidrojen peroksitin uzaklaştırılması
Peroksidaz	Gıdaların lezzet, renk ve besin kalitesinin geliştirilmesi
Asparaginaz	Pişirme sırasında akrilamid oluşumunun azaltılması
Acılık giderici enzimler- naringinaz	Meyve suyunda acı tadın giderilmesi Şarap aroması

Gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan mikrobiyal enzimler şunlardır:

α -amilazlar

α -amilazlar (EC 3.2.1.1), polisakkaritlerin α -1,4 glikozidik bağlarını hidroliz eden, nişastayı hidrolize edip kısa zincirli dekstrinleri üreten enzimlerdir (Sindhu ve ark., 2017). Bu enzimler tüm canlı organizmalarda yaygın olarak bulunurlar. α -amilazların çoğu metalloenzimlerdir, aktiviteleri, stabiliteleri ve bütünlükleri için kalsiyum iyonları gerekmektedir (Sindhu ve ark., 2016). α -amilazların gıda endüstrisindeki geniş uygulamaları fırıncılık, mayalama, nişastayı sıvılaştırmanın yanı sıra sindirimi de sağlamaktır (Couto ve Sanromán, 2006). Ekmek endüstrisinde, ekmek kalitesini artırmak için lezzet arttırıcı olarak dışarıdan ilave edilirler. Ekmeğin tadını, kabuk rengini ve pişirme özelliklerini geliştirirler. Nişasta endüstrisinde, nişastayı glikoz ve fruktoz şuruplarına dönüştürmek için ve nişasta sıvılaştırma aşamasında kullanılırlar (van der Maarel ve ark., 2002).

Proteazlar

Proteazlar, proteinlerde ve polipeptitlerde bulunan peptit bağlarını hidrolizi eden enzimlerdir. Deterjan ve eczacılıkta yaygın olarak kullanılırlar, bunu gıda endüstrisi takip eder. Piyasadaki endüstriyel enzimlerin %60'ını temsil ederler (Singh ve ark., 2016). Proteaz enzimi pazarına yönelik küresel talep, 2014-2019 döneminde yıllık % 5.3 'lük bileşik büyüme oranında büyümektedir. Deri işlemede ve biyolojik iyileştirme proseslerinde uygulama buldukça taleplerin daha da artması beklenmektedir.

Proteaz enzimlerinin başlıca kaynakları bitki, hayvanlar ve mikroorganizmalardır (bakteriler ve funguslar). Proteazlar iki gruba ayrılır: polipeptit zincirleri üzerindeki etki alanına bağlı olarak ekzopeptidazlar ve endopeptidazlardır (Rao ve ark., 1998). Ekzopeptidazlar polipeptit zincirlerinin uçlarına etki ederken, endopeptidazlar polipeptit zincirlerinin iç bölgelerinde hidrolize ederler. Endopeptidazlar ayrıca aktif bölgede bulunan katalitik kalıntıya dayanarak altı gruba ayrılır: serin, aspartik, sistein, metallo, glutamik asit ve treonin proteazlardır (Li ve ark., 2013). Bitki proteazları olan bromelain, fisin ve papain, gıda endüstrisinde mayalama, etin yumuşatılması, sütün pıhtılaştırılması ve sindirime yardımcı olması gibi çeşitli uygulamalar için yaygın olarak

kullanılmaktadır (Patel ve ark.,2013). Ek olarak, proteazlar ayrıca gıda proteinlerinin lezzetini, besin değerini, çözünürlüğünü ve sindirilebilirliğini geliştirmek, ayrıca pıhtılaşma ve emülsifikasyon dahil fonksiyonel özelliklerini iyileştirmek için kullanılır (Aruna ve ark., 2014).

Proteazlar ekmek endüstrisinde ekmek, fırıncılık ürünleri, kraker ve waffle üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler yoğurma süresini azaltmak, ekmekteki gluten ağını düzenlemek, doku ve lezzeti iyileştirmek için kullanılır (Miguel ve ark., 2013; Tucker ve Woods., 1995). *Aspergillus usamii* kaynaklı asit proteaz, buğday gluteninin fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesi için başarıyla kullanılmıştır (Deng ve ark., 2016). Asidik fungal proteazlar, düşük pH'da bile verimli olduklarından biranın aminoasit profilini dengeleyerek biranın fermantasyonunu iyileştirmek için kullanılırlar.

Proteazların bir diğer önemli uygulaması süt endüstrisi ile ilişkilidir. Doğal olarak oluşan proteazlar, peynirin lezzet özelliklerine önemli ölçüde katkıda bulunurlar. Peynirin olgunlaşmasını hızlandırmak, süt ürünlerinin fonksiyonel özelliklerini değiştirmek ve alerjik özelliklerini azaltmak için kullanılır (Damhus ve ark., 2013). Peynir yapımında, proteazlar ayrıca parakazein ve makropeptitler üretmek için ve spesifik peptit bağını hidrolize etmek için de kullanılırlar (Salleh ve ark., 2006).

Laktaz (β -Galaktosidaz)

Laktozun hidrolizi, gıda endüstrisinde önemli bir biyoteknolojik süreçtir (Rosenberg, 2006). β -galaktosidaz enzimi laktozun hidrolizini katalize eder. Hidrolaz ailesine aittir. β -galaktosidaz, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar dahil çok sayıda biyolojik sistemden elde edilebilir (Panesar ve ark., 2010). Endüstriyel uygulamalarda, iki ana β -galaktosidaz sınıfı birincil öneme sahiptir. Bunlar soğuk aktif ve termostabil β -galaktosidazdır. Ticari ölçekte β -galaktosidaz, süt ve süt ürünlerine uygulanmaları için GRAS mikroorganizmalar kullanılarak üretilmektedir. Laktaz, insanlarda laktoz intoleransını azaltmak için süt ve süt bazlı ürünlerde kullanılır. Laktazın bir başka önemli uygulaması da, peynir altı suyunda laktoz hidrolizidir. Peynir üretiminin bir yan ürünü olan peynir altı suyunun ana bileşenleri laktoz, proteinler ve mineraller olup,

besinsel değeri yüksek bir bileşendir (Pivarnik ve ark., 1995; Wołosowska ve Synowiecki., 2004).

Lipazlar

Lipazlar, uzun zincirli trigliseritlerin hidrolizini katalize eden enzimlerdir. Yağları ve lipitleri sindirmek için, insanların ve diğer hayvan türlerinin midesinde ve pankreasında doğal olarak bulunurlar (Fink ve ark., 1984). Mikrobiyal lipazlar bakteri, fungus ve maya tarafından üretilir. Bu enzim, gıda, biyoyakıt, deterjanlar ve hayvan yemi gibi çeşitli endüstrilerde uygulama bulmaktadır. Deri, tekstil ve kağıt işleme uygulamalarında da kullanılır (Gerits ve ark., 2014). Lipazlar; unlu mamüller, süt, meyve suyu, bira ve şarap endüstrilerinde sıkça kullanılmaktadır. Çeşitli endüstrilerde birçok uygulama bulmasına rağmen, lipazın pazar payı küresel endüstriyel enzim pazarının %10'undan daha azdır (Guerrand, 2017).

Ticari lipazlar esas olarak süt ürünlerinde aroma gelişimi ve yağ içeren diğer gıdaların işlenmesi için kullanılırlar (Aravindan ve ark., 2007). Hidrolizden sonra serbest yağ asitleri üretmek için süt yağlarına etki ederek peynirlerin karakteristik lezzetini geliştirebilmektedir (Jooyendeh ve ark., 2009). Farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar kullanılarak farklı peynir tipleri yapılabilir. Lipaz katalizi, peynirin dokusunu ve yumuşaklığını artırır. Lipazlar ayrıca çeşitli fırın ürünlerinin raf ömrünü uzatmak için, tereyağı ve margarinde lezzet geliştirme maddeleri olarak da kullanılırlar (Aravindan ve ark., 2007). Şarap gibi alkollü içeceklerde, lipaz kullanılarak aroma modifiye edilir. Palmitik ve stearik asitlerin varlığı nedeniyle 37 °C'lik bir erime noktasına sahip olan ve 37 °C'de kolayca eriyebilen kakao yağının kalitesii artırmak için de kullanılır (Sharma ve ark., 2001; Jaeger ve Reetz 1998).

Fosfolipazlar

Fosfolipazlar seçici olarak fosfolipidleri yağ asitlerine ve diğer lipofilik maddelere ayırır. Fosfolipazlar gıda endüstrisinde en önemlisi yağların, süt ürünlerinin üretiminde ve çeşitli unlu mamullerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca çeşitli bitkisel yağların gamının giderilmesinde, peynir imalatında ve ekmek imalatında

uygulamalar bulmaktadırlar. Fosfolipazlar yağın stabilitesini arttırmak veya peynir, süt, tereyağı ve dondurmanın verimini en üst düzeye çıkarmak için çeşitli süt ürünlerinin işlenmesinde de kullanılır (De Maria ve ark., 2007).

Esterazlar

Sulu çözeltide, esterazlar, esterlerin asit ve alkole parçalanmasını kolaylaştırır. Buna ek olarak, esterazlar uzun zincirli asilgliserollerden ziyade kısa zinciri hidrolize eder, bu nedenle lipazlardan farklıdır. Esterazlar gıda endüstrisinde ve alkollü içecek endüstrilerinde önemli bir rol oynarlar ve burada çeşitli meyve sularında yağ ve yağın modifikasyonu, koku ve aroma üretimi için kullanılırlar (Panda ve Gowrishankar, 2005).

Lipoksigenazlar

Lipoksigenazlar (LOX), bir *cis*, *cis*-1,4-pentadien içeren lipitlerde çoklu doymamış yağ asitlerinin dioksijenasyonunda rol oynarlar. LOX'lar gıda endüstrisinde aroma üretiminde ve ayrıca ekmek yapımında kullanılırlar. Soya fasulyesi lipooksigenazları (LOX), en çok çalışılan lipooksigenaz enzimidir (Cumbee ve ark., 1997).

Selülazlar

Selülazlar, glikoz birimlerini serbest bırakmak için, polimerik selüloz üzerinde etkili olan ve β -1,4 bağlantılarını hidrolize eden enzimlerdir. Endo-(1,4)- β -D-glukanaz (EC 3.2.1.4), ekzo-(1,4)- β -D-glukanaz (EC 3.2.1.91) ve β -glukozidazlar olmak üzere (EC 3.3.1.21) (Schülein, 1988) üç ana selülaz sınıfı vardır. Selülazların endüstriyel üretimi esas olarak mikrobiyal kaynaklardan, özellikle de bakterilerden ve funguslardan elde edilir. Meyve suyu endüstrisinde işlem performansını ve verimini arttırmak, ekstraksiyon yöntemlerini iyileştirmek, meyve sularının artırılması ve stabilizasyonu için diğer yumuşatıcı enzimlerle kombinasyon halinde uygulanır (Grassin ve Fauquembergue, 1996). Ayrıca kayısı, mango, erik, papaya, armut ve şeftali gibi meyvelerden nektar ve püre eldesinde viskozitesini azaltır, çiçek ve tohumlardan flavonoidlerin ekstraksiyonu için kullanılır. Ayrıca turunçgillerin acılığını azalttığı, aroma ve tadı iyileştirdiği bildirilmektedir (Sajith ve ark., 2016). Selülazlar zeytinyağı

ekstraksiyonunda, şarap üretiminde verimi ve kaliteyi arttırmak için için diğer enzimlerle birlikte kullanılmaktadır (Galante ve ark., 1993; Bamforth, 2009).

Ksilanazlar

Ksilanazlar, hemiselülozun ana bir bileşeni olan ksilanları ayırmak için mikroorganizmalar tarafından üretilir. Üç ana enzim endoksilazlar, ekzoksilazlar ve p-ksilosidazlar sinerjist olarak hareket eder ve hemiselülozdaki ksilan omurgasının parçalanması için gereklidir. Ksilanazlar, aktinomiset bakteriler ve mantarlar gibi mikroorganizmalar tarafından üretilir. Ksilanaz üreten başlıca aktinomiset bakteri türleri *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp. ve *Pseudomonas* suşlarıdır (Sanghi ve ark., 2010; Bajaj ve Singh., 2010; Sharma ve Chand, 2012). Ksilanaz üreten başlıca fungus türleri *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. ve *Penicillium* spp. mikroorganizmalarıdır. Mantar ksilanazları bakteri veya mayadan daha yüksek aktiviteye sahiptir (Mandal, 2015).

Karbonhidrat hidrolize edici enzimler genellikle ekmek yapım endüstrisinde kullanılır. Hamurun reolojik özellikleri, nişasta olmayan polisakkaritlerin enzimatik hidrolizi ile iyileştirilir (Martínez-Anaya ve Jiménez .,1997). Ksilanaz, ekmek yapım endüstrisinde diğer enzimlerle yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekmek hacmini artırabilirler ve bu sayede ekmek kaliteside artmaktadır. Ksilanaz, bisküvilerde lezzeti geliştirmek için kullanılır. Ayrıca meyve suyu üretiminde ekstraksiyon, arıtma ve stabilizasyonu geliştirerek önemli bir rol oynamaktadır (Camacho ve Aguilar.,2003).

Pektinazlar

Pektinazlar, pektik polimerlerde glikozidik bağların hidrolizini katalize eden enzimlerdir. Domates, ananas, portakal, elma, limon posası, portakal kabuğu ve diğer narenciye meyvelerinde bulunan pektik maddeler bu enzim için doğal substrat görevi görür. Pektinazlar, termostabilitelerini ve verimlerini arttırmak amacıyla doğal ve rekombinant mikroorganizmalardan üretilirler (Rebello ve ark., 2017). Pektinaz ilave edilen meyve suları, enzimsiz olanlara göre daha net bir görünüme ve filtre edilebilirliğe sahiptir (Saadoun ve ark., 2013). Elma ve muz gibi doğal olarak elde edilen meyve sularının bulanıklığını azaltmanın yanı sıra, pektinazlar içeceklerin rengini ve lezzetini

de iyileştirirler. Jelatin ve pektin ilavesi, meyve sularının viskozitesini ve bulanıklığını büyük ölçüde artırır ve bulanıklığın giderilmesi, meyve suyu üretiminin en pahalı kısmıdır. Meyve sularında pektinazlar gibi biyojenik enzimlerin kullanılması, iyi sonuçlar elde etmek için mekanik mayşelemeden neredeyse dokuz kat daha iyi etki eder (Pedrolli ve ark., 2009; Tapre & Jain , 2014).

Glikoz oksidaz

Glikoz oksidaz (EC 1.1.3.4), oksidoredüktaz adı verilen geniş bir enzim ailesine aittir. Glikoz oksidaz, 1928'de Müler (Müler, 1928) tarafından keşfedilen bir flavoproteindir. Çözünmüş oksijen varlığında, enzimin glikozu glukonik aside dönüştürebileceğini belirtmiştir. Glikoz oksidaz üretimi ilk olarak *A. niger* ve *Penicillium glaucum*' dan keşfedilmiştir. *A. niger* türleri yaygın olarak glikoz oksidaz üretimi için kullanılır ve suşları daha fazla miktarda glikoz oksidaz üretebilir (Kona ve ark.,2001). *Penicillium adametzii*, hücre dışı glikoz oksidaz üretimi için yaygın olarak kullanılan bir küfdür (Mikhailova ve ark., 2000). Farklı bakteri türlerinin de glikoz oksidaz ürettiği bildirilmektedir.

Glikoz oksidazın, ilaç ve gıda endüstrileri gibi çeşitli endüstrilerde ve biyoyakıt üretiminde geniş kullanımı vardır (Zhu ve ark., 2006). Gıda endüstrisinde diyabetik içeceklerden ve yumurta akından glikoz ve oksijeni gidererek gıda ürünlerinin lezzetini, aromasını ve stabilitesini artırır. Glikoz oksidaz gıda ürünlerinin rengini, dokusunu, lezzetini, raf ömrünü iyileştirir ve çürümeyi önler. Glikoz oksidaz gıda ambalajlarında, oksijeni uzaklaştırarak raf ömrünü uzatmak için kullanılır (Hanft ve Koehler, 2006).

Katalaz

Katalaz (EC 1.11.1.6), aerobik organizmalarda bulunan tetramerik bir proteindir. Hidrojen peroksit ayrışmasına yardımcı olur. Bu enzim, *A. niger* ve *Micrococcus luteus* gibi mikrobiyal kaynaklardan ve sığır karaciğerinden üretilir. Mikroorganizmalar genellikle hızlı büyüme, kolay kullanım ve istenen ürünü elde etmeleri, genetik ayarlama gibi avantajları nedeniyle enzim üretimi için kaynak olarak tercih edilir (Puri ve ark., 2012; Singh ve ark., 2007). Kumaş endüstrisinde katalaz, fazla hidrojen peroksidi kumaştan uzaklaştırmak için kullanılır. Bu enzim çoğunlukla gıda işleme

endüstrisinde diğer enzimlerle birlikte kullanılır. Katalaz, genellikle gıdaların korunması için glikoz oksidazlarla birlikte kullanılır. Ayrıca, süt işleme endüstrisinde süttten peroksidi ortadan kaldırmak için, fırıncılık endüstrisinde ve gıda ambalajlarında glikozu gidermek için, gıdaların oksidasyonunu ve bozulabilirliğini kontrol etmek için uygulanır (Sîrbu, 2011).

Peroksidaz

Peroksidazlar (EC 1.11.1.7), prostetik grup olarak demir (III) protoporfirin IX içeren oksidoredüktaz proteinleridir. Peroksitlerin indirgenmesini, çok çeşitli organik ve inorganik bileşiklerin oksidasyonunu katalize eder (Hamid ve Khalil, 2009). Peroksidazlar bitkilerde, mikroorganizmalarda ve hayvanlarda bulunur. Peroksidaz, hidrojen peroksit veya diğer peroksitleri kullanarak çok çeşitli substratları katalize eder (Holm, 1995).

Bu enzim gıda endüstrisinde gıdaların lezzet, renk, tekstür ve besin kalitesini artırmak için kullanılır. Endüstride fenolik atık suların arıtılmasında kullanılır. Aynı zamanda, konserve sebzelerde haşlama işleminin yeterince yapıldığı bu enzimin tespit edilmemesi ile doğrulanır (Regaldo, 2004).

Asparaginaz

Çeşitli mikrobiyal olarak üretilmiş enzimler arasında, asparaginazlar farmasötik, nutrasötik ve endüstriyel olarak yaygın kullanılan önemli bir enzim sınıfıdır. Asparajin, insanlar için zorunlu olmayan bir aminoasittir, oysa kanserli hücreler için önemli bir aminoasittir. Bu nedenle, asparajinin tükenmesi, antikanser ajan olarak bu enzimin temelini oluşturan kanserli hücrelerin büyümesini kritik olarak etkilemektedir. Yağda kızartma ve pişirme gibi çeşitli gıda işleme yöntemleri, asparajinin bilinen bir kanserojen olan akrilamide dönüşmesine neden olur (Krishnapura ve ark., 2016).

Acılık giderici enzimler- Naringinaz

Naringinaz (EC 3.2.1.40) esas olarak narenciye meyvelerinde bulunan acı flavanon glikozit olan naringinin parçalanmasından sorumludur (Puri ve Banerjee., 2000).

Naringinazın fungus kaynaklarının artan verimi nedeniyle bakteriyel kaynaklardan daha baskın olarak kullanıldığı görülmektedir. Naringinaz, meyve sularındaki acılığı gidermek için gıda işlemede önemli bir role sahiptir. Biyopolimerler ve tatlandırıcılar gibi çeşitli gıda katkı maddeleri ramnosidaz veya naringinaz kullanılarak sentezlenebilir. Yine, naringinazın β -glukozidaz ve arabinosidaz ile birlikte başka bir kullanımı şarabın aromasını iyileştirmektedir (Gallego ve ark., 1996).

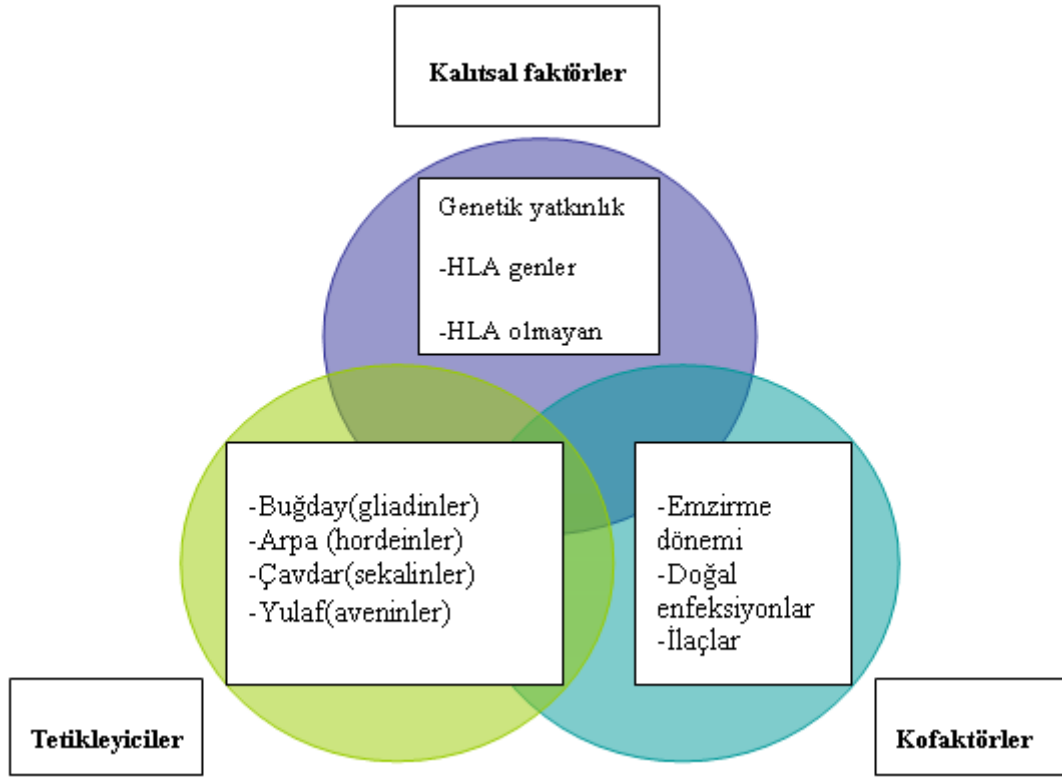
2.3. Çölyak Hastalığı

2.3.1. Giriş

Çölyak hastalığı (ÇH), (celiac sprue, glutene duyarlı enteropati), ince bağırsak mukozasında villusun tahribatına sebep olan ve genetik olarak duyarlı insanlarda, buğdaydaki gliadinler, çavdardaki sekalinler ve arpadaki hordeinlerin (Di Sabatino ve Corazza, 2009) alınmasıyla uyarılan kronik bir enflamatuardır. Yulaftaki aveninlerin durumu ise hala tartışmalıdır. Gliadinler, sekalinler ve hordeinler yüksek oranda glutamin ($\approx\%38$) ve prolin ($\approx\%20$) aminoasitleri içermektedir. Yulaf prolamini aveninler de ise prolin aminoasitlerinin oranı $\approx\%10$ 'dur (Auricchio ve ark., 2004). Literatürdeki bazı çalışmalar, yulaf tüketiminden sonra hiçbir semptom gözlenmediğini ve biyopsi sonuçlarında mukozanın zarar görmediğini göstermektedir (Dissanayake ve ark., 1974; Holm ve ark., 2006). Öte yandan, abdominal şişkinlik oluşumu, bağırsak semptomlarının artması ve ayrıca yulaf tüketiminden sonra villus hasarı da bildirilmiştir (Lundin ve ark. 2003; Peräaho ve ark., 2004). Genel olarak, sınırlı miktarda saf ve kirlenmemiş yulaf zararsız olarak kabul edilmektedir (Rashid ve ark., 2007).

2.3.2. Mekanizma ve tanı

Çölyak hastalığına genetik ve çevresel faktörler neden olmaktadır. Spesifik insan lökosit antijeni (HLA) sınıf II genleri olarak bilinen, HLA-DQ2 ve HLA-DQ8'in çoğunun çölyak hastalarında bulunduğu rapor edilmiştir (Catassi ve Fasano, 2008a). Genetik yatkınlık, buğday, arpa ve çavdar tüketiminin etkileri ve emzirme dönemi gibi diğer bazı çevresel faktörler Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

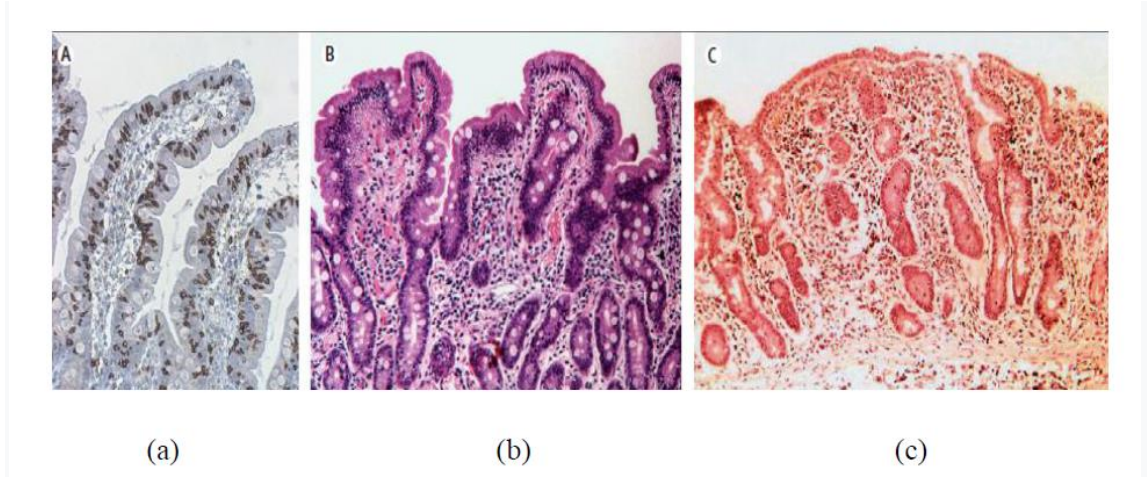


Şekil 2.1. Çölyak hastalığında rol oynayan faktörler (Di Sabatino ve Corazza, 2009)

Girişte belirtildiği gibi, gliadin yüksek prolin ve glutamin içeriğine sahiptir. Prolin sonrasını parçalama aktivitesi olmayan insan sindirim sistemi enzimleri gliadin üzerinde baskın bir etkiye sahip değildir (Stepniak ve ark., 2006; Lindfors ve ark., 2008). İnce bağırsakta, doku transglutaminaz (tTG) ile glutamin deamidasyonu meydana gelir ve bu glutamik asit oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Gliadin peptidleri deamidasyondan sonra HLA için, artan bir afiniteye sahiptir. Proinflamatuvar sitokinleri serbest bırakan bağırsak T hücreleri, gliadin peptidleri ve HLA molekülleri arasındaki etkileşim ile aktif hale gelmektedir. Enterositler hasarlıdır, enflamatuvar hücrelerinin lamina propria infiltrasyonunun meydana gelmesi ile bağırsak kriptlerinin çoğalması artacak ve villus atrofi (körelme) meydana gelecektir (Şekil 2.2) (Catassi ve Fasano, 2008b; DiSabatino ve Corazza, 2009). Şekil 2.4’ de mekanizma ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

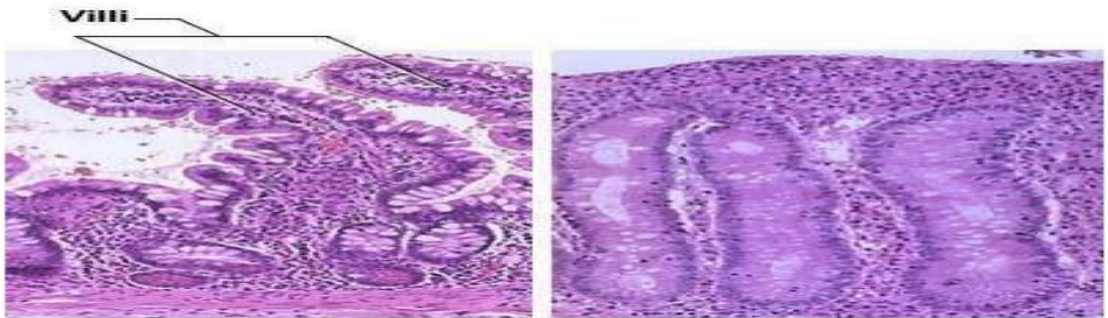
T hücresi aktivasyonu ile ilgili olmayan başka bir mekanizma da rapor edilmiştir. T hücreleri tarafından tanınmayan biyolojik olarak aktif dizilerin mevcudiyeti, doğal

bağışıklık aktivasyonuna neden olmaktadır. Hücresel büyüme ve tirozin kinaz reseptörlerinin aktivitesini artırmaktadır (Auricchio ve ark., 2004).

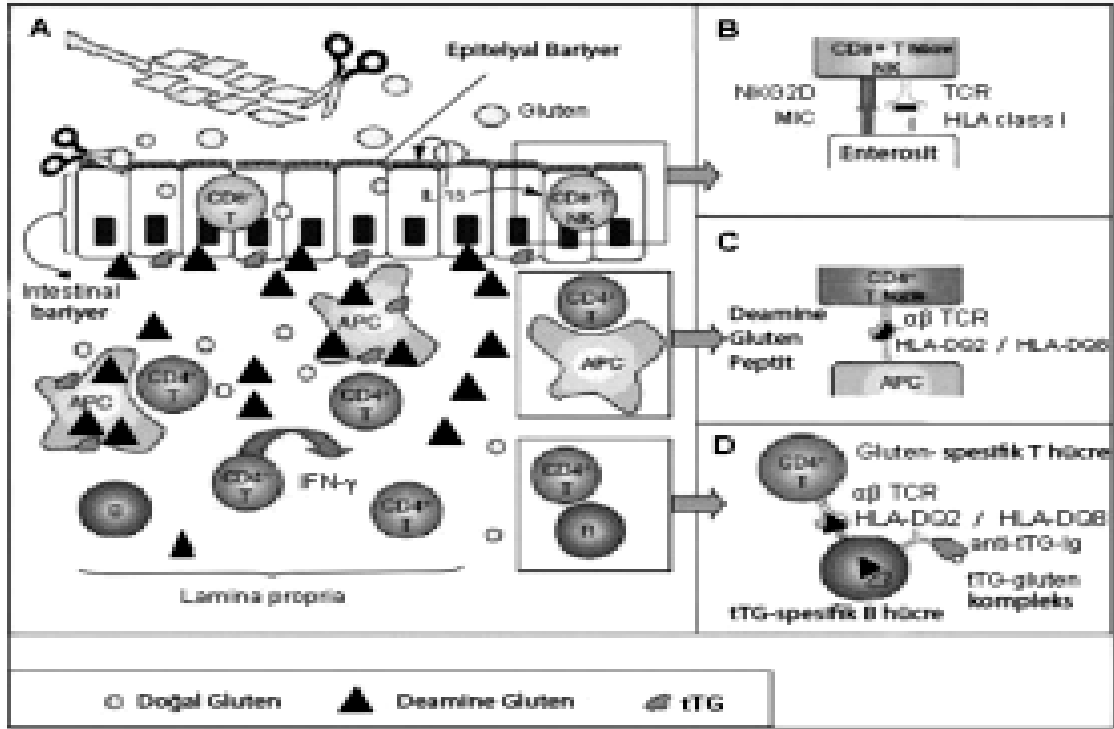


Şekil 2.2. Çölyak hastalığının farklı dönemlerinde villus yapılarının resimleri (a) Atrofik olmayan lezyon (b) Kısaltılmış villuslu atrofik (c) Artık saptanamayan villuslu atrofik (Di Sabatino ve Corazza, 2009)

Gliadinin zararlı etkisi çölyak hastalarında ince bağırsak üzerinde olmaktadır. İnce bağırsak mukozasındaki absorpsiyonu sağlayan, villi adı verilen parmak şeklindeki çıkıntılar, gluten alımı ile kısalmakta veya tamamen ortadan kalkarak bağırsak iç yüzeyinin düzleşmesine sebep olmaktadır. Böylelikle, absorpsiyonun yapıldığı yüzey azaldığı için besin alımı da zorlaşmaktadır (Türksoy ve Özkaya, 2006; Özüğür, 2011). Bunun sonucu olarakta, çölyak hastalarında vitamin ve mineral eksikliği sıklıkla görülmektedir.



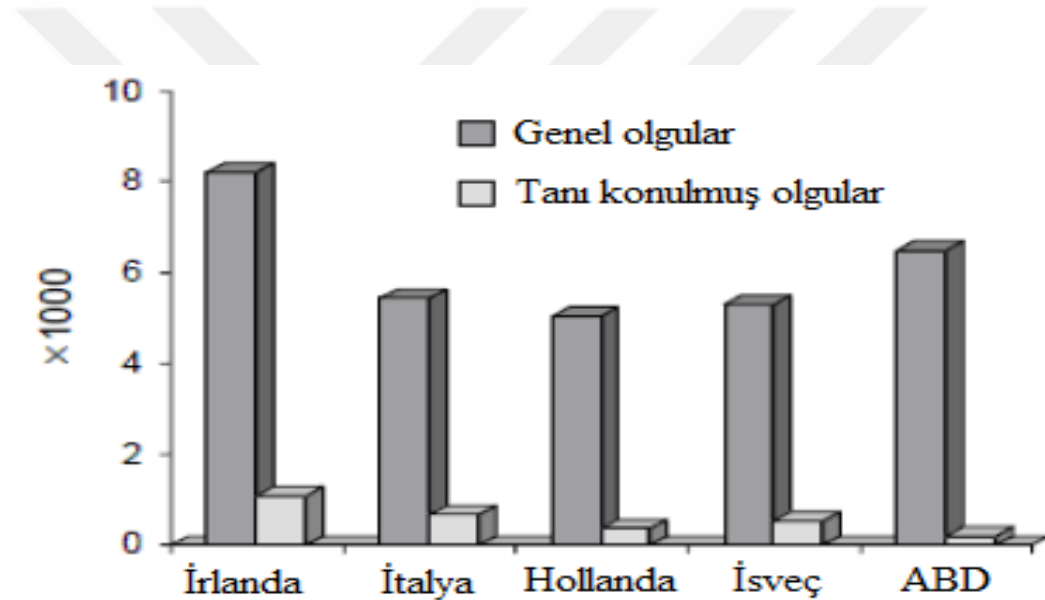
Şekil 2.3. Sağlıklı (solda) ve çölyak hastası (sağda) bireylerin bağırsak dokusu (Anonim, 2011)



Şekil 2.4. Kazanılmış ve doğal immün yanıt mekanizmalarını gösteren çölyak hastalık lezyonu (A). Gluten peptitleri epitelyal bariyer boyunca geçirilmekte ve doku transglutaminaz (tTG) ile deamine olmaktadır. Lamina propria'daki CD4+T hücreleri antijen sunan hücrelerin hücre yüzeylerinde bulunan HLA-DQ2 veya HLA-DQ8 molekülleriyle sunulan gluten peptitlerini tanımaktadır. Epitelyumda CD8+ T hücreleri NKG2D gibi doğal katil (NK) hücre reseptörlerini eksprese etmektedir. Gluten için spesifik olan B hücreleri ve tTG'ler lamina propria'dadır. (B). NKG2D tarafından upregüle olan intraepitelyal T hücreleri direkt olarak MIC moleküllerini eksprese eden enterositleri yok etmekte ya da TCR (T hücre reseptörü) aktivasyon eşiğini düşürmektedir. Gluten, IL-15 ekspresyonunu teşvik ederek NKG2D ve MIC ekspresyonunu başlatmaktadır. (C). HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 molekülleri tTG tarafınca deamine edilmiş gluten peptitlerine yüksek afinite ile bağlanmaktadır. (D). Gluten spesifik T hücreleri intramoleküler yardımla tTG'ye karşı antikor oluşumunu kontrol etmektedir (Sollid ve Jabri, 2005).

Avrupa nüfusunda her 100-550 kişiden biri çölyak hastasıdır (Fasano ve Catassi, 2001). Her yaşta görülebilen bir bağışıklık sistemi hastalığı olup, çocuklarda ve yetişkinlerde ömür boyu devam eden bir hastalıktır (Trancone ve Jabri, 2011). Belirtileri bireyler

arasında çok çeşitlidir. Kronik ishal, karın ağrısı ve şişkinlik, gaz şikayetleri, kusma, malabsorpsiyon, büyüme geriliği, iştahsızlık, demir eksikliği, anemi, spesifik olmayan artrit, eklem ağrıları, depresyon, ağız içinde oluşan aftlar, ciltte kaşıntılı döküntüler ve düşük kemik mineral yoğunluğu gibi belirtilerin bir kısmı kişiden kişiye değişiklik göstererek görülmektedir (Mearin, 2007). Çünkü bu sorunlar, sadece çölyak hastalığına özgü değildir ve diğer sağlık sorunlarını da hatırlatmaktadır. Bu sebeple, tanısı zaman alabilmektedir. Öte yandan, bazı durumlarda hiçbir belirti bile yoktur. Sonuç olarak; teşhis edilen vakalar, genel hastaların küçük bir kısmını oluşturmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Farklı ülkelerde çölyak hastalığı prevalansı. Beyaz çubuklar klinik olarak tanı konulmuş olguları, gri çubuklar genel olguları temsil eder (Catassi ve Fasano, 2008a)

Buzdağı modeli, klinik durumun mevcut durumunu göstermek için çok faydalı bir gösterimdir (Şekil 2.6). Şekilde buzdağının tepesi, glutensiz bir diyeti takip eden tanı konmuş çölyak hastası kişilerinden oluşmaktadır. Su seviyesinin altında ise, teşhis edilmemiş çölyak hastaları vardır. Bunlarda hiçbir belirti yoktur ve belirtileri ÇH ile bağlantılı değildir. Sonunda, buzdağı altındaki potansiyel çölyak hastaları mevcuttur. Onlar genetik olarak uygundur, fakat hastalık gelişmez (Gallagher ve ark., 2004; Mearin, 2007).



Şekil 2.6. ÇH'nın buzdağı modeli (Mäki ve Collin, 1997)

ÇH'nın tanısı, anti-gliadin (AGA), antiendomisyal (EMA) ve anti-doku transglutaminaz (anti-tTG) gibi serum antikorlarının tespitinden oluşmaktadır. AGA, tedavi almayan çölyaklı hastaların bağırsak sekresyonlarında ve serumda bulunmaktadır. AGA, IgA ve IgG antikorları tayini genellikle ELISA ile yapılmaktadır. Çölyak hastalığında AGA testinin duyarlılığı ve özgüllüğü hasta popülasyonuna göre değişiklik göstermektedir.

Çölyak hastalığının tanısında AGA IgG'nin duyarlılığı yüksek olmasına rağmen; romatoid artrit, sjögren sendromu, sarkoidoz, pemfigus ve atopik egzema gibi çeşitli otoimmün hastalıklarda da pozitif olabilmektedir. Bu nedenle hem IgA ve hem de IgG tipi AGA'nın tayin edilmesi, testin duyarlılığını ve özgül ağırlığını artırmaktadır (Bode ve Gudmand, 1994). Tek başına IgA bakılması ise total IgA eksikliğinde yanlış negatif sonuç verebileceği için sakıncalıdır. Glutensiz diyet sırasında AGA'nın negatifleşmesi ve gluten alınmasından sonra yeniden pozitif olması olası bir mukoza relapsını göstermektedir (Mayer ve ark.,1989; Kilander ve ark.,1987) EMA, ilk kez 1983'de tanımlanıp düz kas fibrillerinin etrafındaki kollajen dokuya karşı gelişmektedir (Chorzelski ve ark., 1983). EMA IgA, çölyak hastalığında en spesifik antikor olup duyarlılık ve özgüllüğü hemen hemen %100'dür. Hastalığın tanısında tarama testi olarak kullanılması önerilen antikor testinin EMA olmasına rağmen bu testin kullanımını sınırlayan iki faktör vardır:

1-İki yaşın altındaki çocuklarda duyarlı olmaması,

2-Selektif IgA eksikliği olan çölyak hastalarında yanlış negatif sonuç verebilmesidir. (Crabbe ve Heremans, 1967). EMA titresi, mukozadaki hasarın şiddeti ile ilişkilidir ve glutensiz diyetle başladıktan sonraki 6 ay veya 1 yıl içinde negatifleşir (Ferreira ve ark., 1992). Bir serolojik çalışmada gösterilmiştir ki; bütün antikor testlerinin (AGA IgG ve IgA, EMA) pozitif veya negatif olması ile %99 oranında çölyak hastalığının olup olmadığı belirlenebilmektedir (Burgin-Wolff ve ark., 1991). Elde edilen sonucu doğrulamak için ince bağırsak biyopsisi veya oral endoskopi yapılması gerekmektedir (León ve ark., 2005).

Çölyak hastalığının; Tip I Diyabet hastalığı, dermatit herpetiformis, otoimmün tiroidit, vaskülit, otoimmün alopesi ve hepatit vb. otoimmün hastalıklarla da aynı zamanda bir ilişkisi olduğu bilinmektedir (León ve ark., 2005). Çölyak hastalığının diğer hastalıklarla olan ilişkileri şu şekildedir:

- ÇH, Tip I Diyabet hastalarının %5'inde görülmektedir.
- Addison hastalığı, alopesi areata, otoimmün tiroidit, Sjögren sendromu ve romatoid artrit çölyak ile ilişkili otoimmün hastalıklardandır.
- Down Sendromlu hastalarda genel popülasyona göre ÇH 25 kat daha sık görülmektedir.
- ÇH eğer tedavi edilmezse hastaların uzun vadede bağırsakları geri dönüşü olmayacak şekilde zarar görmektedir.

Hastalığın ilerlemesi sonucunda çölyak hastası olan bireyler maligniteler açısından da risk altındadırlar (Örün, 2005).

ÇH tedavi edilmezse vitamin ve mineral eksiklikleri, laktoz intoleransı, uzun vadede demir eksikliği, osteoporoz ve osteopeni (kemik erimesi), infertilite (gebe kalamama), düşük doğumlar, kas krampları, santral ve periferik sinir sistemi hastalıkları, safra kesesi hastalıkları, epileptik nöbetler, ataksi, demans, migren, miyopati, Ig A eksikliği, karaciğer enzimlerinde bozukluk, mikroskobik kolit, daha da ilerlerse bağırsak lenfoması, bağırsak kanseri gibi hastalıklara sebep olabilmektedir.

2.3.3. Klinik bulgular

Çölyak hastalığı çok farklı semptomlar ve bulgularla kendisini göstermektedir. Son zamanlarda; karın şişliği, ishal, iştahsızlık gibi semptomlar daha az görülmektedir (Ravikumara ve ark., 2006). Bazı hastalarda bulgular belirgin olurken, bazılarında çok hafif görülebilmektedir (Lindfors ve ark., 2011). Bu özelliği nedeniyle, çölyak hastalığı 5 klinik tipe değerlendirilmektedir:

1. Tipik (Klasik) ÇH
2. Atipik ÇH
3. Sessiz ÇH
4. Potansiyel ÇH
5. Latent ÇH

Tipik (Klasik) Çh

Tipik (Klasik) çölyak, daha çok bebek ve küçük çocuklarda, 6-24. aylarında ek besinlere başlanınca gluten alımı sonucu ortaya çıkmaktadır. Karında şişlik, halsizlik, iştahsızlık, kusma, kronik ishal, büyüme geriliği, adale zayıflığı gibi belirtiler görülmektedir. Emilim ve sindirim bozukluğu ön planda olmaktadır. Demir, folik asit ve D vitamini eksikliği (kemik gelişme bozuklukları) ile kanamaya eğilim (pıhtılaşma bozuklukları) sıkça görülmektedir.

Ayrıca tanıda laktoz intoleransı (süte bağlı karın ağrısı, şişkinlik, ishal) ve bazı paraziter hastalıkların (giardiasis) mutlaka araştırılması gerekmektedir (Ravikumara ve ark., 2006; Lindfors ve ark., 2011).

Atipik Çh

Hastalığın bu türüne ise genellikle 5-6 yaş üstü büyük çocuklarda ve erişkinlerde rastlanmaktadır. Genellikle bulgular çok hafif görülür ve sindirim sistemi dışı bulguları ön planda olmaktadır. Hastalar tek bir belirti ya da bulguya sahip olabilmektedir. Boy kısalığı, pubertede gecikme, diş minesini defektleri ve demir eksikliğinin yanında

sindirim sistemine ait tekrarlayan karın ağrısı, bulantı, kusma, karaciğer enzimlerinde yükselme ile kabızlık gibi tipik olmayan bulgular görülebilmektedir. Bu hastalara tanı koymak oldukça zor olmaktadır. Söz konusu şikayetleri olan kişilerde çölyak hastalığının mutlaka düşünülmesi gerekmektedir.

Atipik çölyak huzursuz bağırsak sendromu ile karışabilmektedir. Açıklanamayan demir, folik asit ve B12 vitamini eksikliği ile kemik gelişme problemleri, tekrarlayan karın ağrısı, karın şişliği ve serum albümin düzeyinde düşme gibi durumlarda da çölyak hastalığının akla getirilmesi önem taşımaktadır (Ravikumara ve ark., 2006; Lindfors ve ark., 2011).

Sessiz Çh

Çölyak açısından herhangi bir şikayeti ve bulgusu bulunmayan bireylerin, yakınlarına çölyak hastalığı teşhisi konmasının sonucunda, yapılan aile taramalarında veya herhangi bir başka nedenle yapılan tetkiklerde tesadüfen tipik çölyak hastalığının rastlanmasıdır (Ravikumara ve ark., 2006).

Potansiyel Çh

Çölyak testlerinde pozitif sonuç çıkan, ancak ince bağırsak biyopsileri normal ya da minimal değişiklik gösteren bir durumdur. Sonraki yıllarda gluten hassasiyeti çıkacağından düzenli doktor kontrolünde izlenmesi gerekmektedir (Lindfors ve ark., 2011).

Latent Çh

Enteropatisi olmayan ancak, HLA genine sahip ve hayatlarının bir döneminde glutene duyarlı enteropatisi gelişen kişilerdir. ÇH belirtileri bu kişilerde olabilir ya da olmayabilir. Aynı zamanda serolojik testlerde de, antikorları da pozitif ya da negatif olabilir (Lindfors ve ark., 2011).

2.3.4. Gluten proteinlerinin toksik fragmanları (çölyak hastalığından sorumlu peptitler)

ÇH'na sebep olan epitopların, gliadin ve diğer prolaminlerde bulunan glutamin ($\approx\%38$) ve prolin ($\approx\%20$) aminoasitlerinden zengin peptitlerin olduğu bildirilmiştir (Mika ve ark., 2015). Gliadinlerin toksisitesi gliadinlerin gastrointestinal enzimler tarafından hidrolizi sonrası üretilen peptitlerden kaynaklanır. Uzunlukları farklı olan bu peptitlerin N- ya da C- terminallerindeki peptit bağları, gastrik, pankreatik ve ince bağırsak fırçamsı kenar membranlarındaki endo ve ekzo peptidazlara karşı dirençlidirler (Cavaletti ve ark., 2014). Gliadinlerin tersiyer yapıları toksisiteden sorumlu değildir (Wieser ve Kieffer, 2001). Gliadini toksik yapan ana nedenler;

- Düşük sindirimi,
- Bağırsak T hücreleri için epitopların varlığı,
- Doku transglutaminaz ile deamidasyon sonrası HLA moleküllerinin daha yüksek afinitesi,
- T hücreleri tarafından tanınmayan biyolojik aktif dizilerin varlığıdır (Auricchio ve ark., 2004; Kömen, 2010).

α -Gliadinlerin N-terminal alanı, çölyak hastalığının ana aktivatörüdür ve toksik olarak belirtilen peptid dizileri PSQQ ve QQQP olarak belirlenmiştir (Wieser, 1995). Toksik olarak belirtilen bazı fragmanlar, α -gliadinin 31-43 fragmanlarıdır (Marsh ve ark., 1995). İmmün epitop veritabanında, (Immune Epitope Database- IEDB) çölyak hastalığı ile ilgili buğdaya ait, 94'ü α -gliadin geninde, 74'ü γ -gliadin geninde, 12'si ω -gliadin geninde, 8'i düşük molekül ağırlıklı glutenin geninde ve 2'si yüksek molekül ağırlıklı glutenin geninde olmak üzere toplam 194 adet T hücre uyarıcı epitop belirlenmiştir (Comino ve ark., 2013). Glutende bulunan en önemli ÇH-immünojenik sekansın α -gliadindeki 33-mer peptidi olduğu bildirilmiştir. Buna karşın 890'ı aşan α -gliadin aminoasit sekansının sadece 19'u 33-mer peptidi içermektedir. Bu nedenle, hangi tahıl türünün, hangi konsantrasyonlarda 33-mer fragmanlarını içerdiği önemlidir. Schalk ve arkadaşları, tahıllardan elde edilen unların 91-603 $\mu\text{g/g}$ aralığında 33-mer peptidi içerdiğini, ancak $\alpha 2$ -gliadinleri kodlayan D-genomunun bulunmaması nedeniyle tetraploid ve diploid buğday türlerinde (makarnalık buğday, emmer ve siyez buğdayı)

33-mer peptidine rastlanmadığını bildirmişlerdir (Schalk ve ark., 2017). Shan ve arkadaşları, α 2-gliadinde bulunan 33-mer peptitlerinin intestinal peptidazlara karşı dirençli olduğunu göstermişlerdir. Örtüşen üç farklı T hücre epitopu içeren ve güçlü bir immün yanıt başlatan 33-mer peptidi en güçlü immün dominant gluten peptidi olarak kabul edilmektedir (Shan ve ark., 2002).

2.3.5. Glutensiz diyet ve ürün pazarı

Glutenin diyetten kesin olarak çekilmesi çölyak hastaları için çok önemlidir. Çünkü tek tedavisi glutensiz diyetdir. En başta buğday olmak üzere, arpa, çavdar ve yulaf içeren ürünleri çölyak hastalarının tüketmemesi gerekmektedir (Holm ve ark., 2006). Hazırladıkları yiyeceklerde ana tahıl grubunu, pirinç ve mısır oluşturmaktadır. Soya, patates gluten içermediğinden, çölyak hastaları tarafından hem kendileri hem de unları tüketilebilmektedir. Çölyak hastalarında, diğer besin öğeleri ve vitamin eksikliği saptandığında, bunlar dışardan destekleyici tedavi olarak diyetlerine eklenmelidir. Çölyak hastası bireyleri, bağırsak epitelinin hasarına bağlı olarak gelişen ve sekonder disakkaridaz enzimi eksikliğinden dolayı, bağırsak mukozası düzelene kadar ilk haftalarda süt, süt ürünleri, meyve ve meyve sularından da kaçınmaları gerekir (Green ve Cellier, 2005).

Sıkı bir glutensiz diyetin takibi sonrası, mukozal iyileşmeye ve sağlıklı ince bağırsaklara kavuşulmaktadır. Codex Alimentarius'ta (Codex Alimentarius Komisyonu, 2008), glutensiz diyet ürünleri olarak tanımlanan yiyeceklere ait özellikler aşağıda verilmiştir:

- a) "Glutensiz gıdalarda gluten miktarı kuru madde üzerinden 20 mg/kg'ı geçemez."
- b) "Gluteni azaltılmış gıdalarda gluten miktarı kuru madde üzerinden 100 mg/kg'ı geçemez."
- c) "Doğası gereği gluten içermeyen bileşenler ile gluteni azaltılmış bileşenlerin karışımından oluşan gıdalarda gluten miktarı kuru madde üzerinden toplam 100 mg/kg'ı geçemez."

d) “Bu tebliğ kapsamında yer alan ürünlerin belirlenen limitleri aşmaması amacıyla, üretim hattında kontaminasyonun önlenmesi için gerekli tedbirler alınmalıdır.”

Uygulamada, tolere edilen gluten miktarı kişiden kişiye değişmektedir. Literatürde, bugüne kadar kesin olarak ifade edilememiş ve çeşitli literatür çalışmalarında farklı sınırlar belirtilmiştir. Genellikle, günde 10 mg’dan daha az gluten alımı muhtemelen zararsız olarak kabul edilir ve kodeks standardına göre çok düşüktür (Akobeng ve Thomas, 2008). Özellikle düşük gluten içeren gıdalar açısından, uygulamada (20-100 ppm) eşiği dikkate alınmaktadır. Öte yandan, gıda ürünlerinde gluten konsantrasyonu yerine gluten alımı eşiğini toplam olarak belirtmek daha uygundur (Akobeng ve Thomas, 2008; Mearin, 2007).

Glutensiz diyetle yer alan serbest ve sakıncalı besinlerin neler olduğunu çölyak hastaları ve yakınları tarafından iyi bilinmesi gerekmektedir. Çölyak hastalarının, tüketebileceği ve tüketemeyeceği gıdalar Çizelge 2.3’ de belirtilmektedir:

Çizelge 2.3. Çölyak hastaları için, serbest ve yasak olan yiyecekler (Anonim, 2020)

YİYECEK GRUPLARI	SERBEST YİYECEKLER	YASAKLANAN YİYECEKLER
TAHILLAR	Pirinç, pirinç unu ve nişasta ile yapılmış yiyecekler, patates, mısır ve soya fasulyesi unu ile yapılmış ekmek, tarhana, karabuğday	Buğday, yulaf ve çavdar unu ile yapılmış her türlü yiyecek= Bulgur, makarna, şehriye, erişte, kuskus, bisküvi, simit, dondurma külahı, ekmek, tarhana, yarma, ırmik, kraker, börek, pasta, çörek, galeta unu,
ÇORBALAR	Sebze çorba, pirinç çorba, pirinçle yapılmış yayla çorba, mercimek ve mercimek unu çorba, et ve tavuk suları ile yapılmış çorbalar	Şehriye çorba, un çorbası, tarhana çorba, düğün çorba, unlu domates çorba, erişte çorbası, her türlü hazır çorba
TATLILAR	Buğday, çavdar unu katılmamış her türlü tatlı, şeker, bal, pekmez, lokum, komposto, hoşaf, sütlü tatlılar	Unlu tatlılar (baklava, tulumba, revani, lokma, vs.), kek ve pastalar, çörek, gofret, kurabiye, çikolata, puding
ET, BALIK, KÜMES HAYVANLARI, SAKATATLAR ve YUMURTA	Her türlü et yemekleri, etli kuru baklagiller yemekleri	Ekmek konmuş köfte, bulgurlu kıymalı yemekler, unla kızartılmış balık, sosis
KURU BAKLAGİLLER	Hepsi	Hiçbiri
SEBZE-MEYVE	Hepsi	Hiçbiri
SÜT ve TÜREVLERİ	Süt, yoğurt, peynir, pirinç ve pirinç unu ile yapılan tatlılar	Buğday unu konmuş sütlü tatlılar, bulgur konmuş yoğurtlu ve sütlü çorbalar
İÇECEKLER	Çay, ıhlamur, süt, ayran, meyve suları, limonata, gazoz, kolalı içecekler, sahlepe	Boza, Not: Limon suyu, greyfurt, mandalina ve portakal suları ilk hafta verilmez.

Bu noktada, hastalar çeşitli zorluklarla karşılaşır. Birçok gıda ürününün örneğin, ekmeklerin ve hamur işlerinin içeriğinde yaygın olarak gluten bulunmakta ve tüketilmektedir. Piyasadaki mevcut glutensiz ürünler sınırlı sayıdadır. Mevcut olan ürünlerde çok pahalıdır ve bunlar genellikle nişasta bazlıdır ve diğer glutenli ürünlerle karşılaştırıldığında kalorisini yüksek, kalitesinde düşüktür. Doğal olarak glutensiz gıdaların kontaminasyonu, glutensiz buğday nişastasını içinde kalan gluten ve gıdaların yanlış etiketlenmesi gibi problemlerle de karşılaşmaktadır. Bu nedenlerden dolayı glutensiz bir diyeti takip etmek oldukça zordur. Alerjen uyarıları paketlerin üzerine mutlaka yazılmalıdır. Sosyal baskı da bir başka önemli faktördür, bu da hastaları özellikle de gençleri gluten içeren gıdalar tüketmeye zorlamaktadır (Mearin, 2007; Leffler ve ark., 2008; Catassi ve Fasano, 2008b; Lerner, 2010).

Tüm dünyada glutensiz ürünler büyüyen bir pazar oluşturmaktadır. Birkaç şirket ekmek, makarna, kurabiye, bisküvi vb. gibi glutensiz ürünler üretmektedir. Ülkemiz pazarındaki ürünler ağırlıklı olarak ithal ürünlerden oluşmaktadır. Glutensiz ekmek ve un karışımları (METVAK A.Ş., Sinangil Gıda San. Tic.ve Paz. A.Ş., İstanbul ve Ankara Halk Ekmek A.Ş.), glutensiz bisküvi (Pronot, Eti Gıda San. ve Tic. A.Ş.) ve glutensiz müsli (Doğa Bitkisel Ürünler San. ve Tic. A.Ş.) ülkemizde üretilen tek ürünlerdir. İthal edilen ürünler neredeyse 10 kat daha fazla yüksek maliyetlere sahip ve bu da onları daha az ekonomik hale getirmektedir. Ürünlerin yüksek maliyeti nedeniyle, hastalar glutensiz diyet ürünlerine uymakta zorluk çekmektedirler (Kömen, 2010).

2.3.6. Yeni terapiler

Glutensiz diyetin birçok olumsuz sonucu olduğu için, çölyak hastalığının tedavisinde alternatif teknikler incelenmiştir. Oral enzim takviyeleri ve laktik asit bakterileri ile gliadinlerin enzimatik hidrolizi önemli yaklaşımlardan biridir. Bir oral takviye olarak, *A. niger* adı verilen küften elde edilen Prolil EndoPeptidaz (PEP) tanımlanmıştır. AN-PEP, mide pH'ında aktiftir, düşük pH ve pepsin tarafından sindirime karşı dirençlidir (Stepniak ve ark. 2006). Prolil OligoPeptidaz'ın (POP) mide asidinde etkisini büyük ölçüde yitirmesinden dolayı, (PEP)'in gluteni sindirmesi POP'dan 60 kat daha fazladır (Meresse ve ark., 2009). Düşük pH'da aktivite gösterebilecek maya kaynaklı prolil endopeptidazın (PEP) duodenumda T hücre aktivasyonunu önlediği bildirilmişse de, bu

etki ancak yüksek dozlarda kullanıldığında geçerli olmaktadır. Düşük dozlarda ise enzim aktivitesi, immüno stimulan peptidlerin epitelden geçişini engelleyememektedir. Fakat, yine de PEP glutensiz diyetle yardımcı ve umut verici bir tedavi olarak araştırılması gerekmektedir (Pyle ve ark., 2005).

Laktik asit bakterileri (LAB) , gluteni enzimatik olarak parçalama da diğer bir seçenektir. Ekşi hamur gluten ve LAB.'nin her ikisini de içermekle dikkat çekmektedir. LAB ile maya proteazlarının kombinasyonu uygulanarak gluten miktarı 10 mg/kg'ın altına düşürülmüştür (Yağmur, 2013).

HLA-DQ2 / DQ8'in bloke edilmesi, göz önünde bulundurulması gereken başka bir husustur (Mearin, 2007). Alternatif olarak, seçici (doku transglutaminaz) tTG'in inhibisyonu kullanılabilir ancak bu prosedürün diğer önemli biyolojik mekanizmalara etkileri bilinmemektedir (León ve ark., 2005).

Tahıl zararlısı sünenen elde edilen sistein ve serin endopeptidaz grubu enzimlerin gluteni etkin bir şekilde parçaladığı tespit edilmiştir. Çörek otu bitkisinden elde edilen enzimle de gliadin fraksiyonlarının tümünün parçalanması 24 saat inkübasyon sonucunda gerçekleştiği görülmüştür.

Gliadinlerdeki biyolojik aktif peptid dizilerini elimine etmek için, glutenin genetik modifikasyonu ile ilgilide birçok çalışma vardır (León ve ark., 2005). Bölgeye yönelik buğdayın mutajenezi pişirme kalitesinin etkilenmediği bir avantaja sahiptir. Ancak, sık sık tekrarlanan aminoasit dizileri nedeniyle pratikte zordur. Diğer yandan, antijenik peptitlerin gelişmesini mümkün kılan spesifik epitoplara tanımlanabilmektedir (Catassi ve Fasano, 2008b).

2.4. Gluten

Glutensiz Gıdalar Tebliği'ne göre, gluten terimi, genel olarak "buğday, arpa, çavdar, yulaf, tritikale veya bunların melezlerinde veya türevlerinde bulunan, suda ve 0.5 M NaCl'de çözünmeyen, bazı insanların intolerans gösterdiği proteinlerdir" (Glutensiz Gıdalar Tebliği, R.G. Sayısı: 25242, R.G. Tarihi: 27.09.2003). Aynı tahılların depo

proteinlerinden olup, prolamin proteinleri olarak adlandırılan bu proteinler, buğday gluteninin %50'sini (gliadinler) oluşturan ve %40-70'lik etil alkolde çözülebilen proteinlerdir (Rosell ve ark., 2014). Toplam buğday proteininin yaklaşık %80-85'ini oluşturan buğday depo proteinidir (Van der Borgh ve ark., 2005). Gluten proteini olgun buğday tanesinin, unun elde edildiği kısmı olan endosperminde bulunur ve nişasta granüllerinin etrafında bir ağ yapısı oluşturur. Genellikle su ve seyreltik tuz çözeltisinde çözünmez (Goesaert ve ark., 2005).

Yaş gluten (öz), buğday veya buğday unundaki, suda çözünen proteinlerin (albümin), seyreltik tuz çözeltilerinde çözünen proteinlerin (globulin) ve nişastanın %2'lik tamponlanmış tuz çözeltisiyle yıkanarak uzaklaştırılması ile elde edilmektedir. Yaş gluten, kuru maddede %75-86 oranında protein ve %65 oranında su içermektedir. Geriye kalan kısımda ise, karbonhidrat ve lipid bulunmaktadır (İşleroğlu ve ark., 2009).

Tahıllardaki depo proteinleri, etanolde çözünebilen prolaminler ve polimerik gluteninler olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır (Ciclitira ve ark., 2005). Gluten kompleksi, gliadin ve glutenin proteinlerinin bir karışımıdır (İşleroğlu ve ark., 2009).

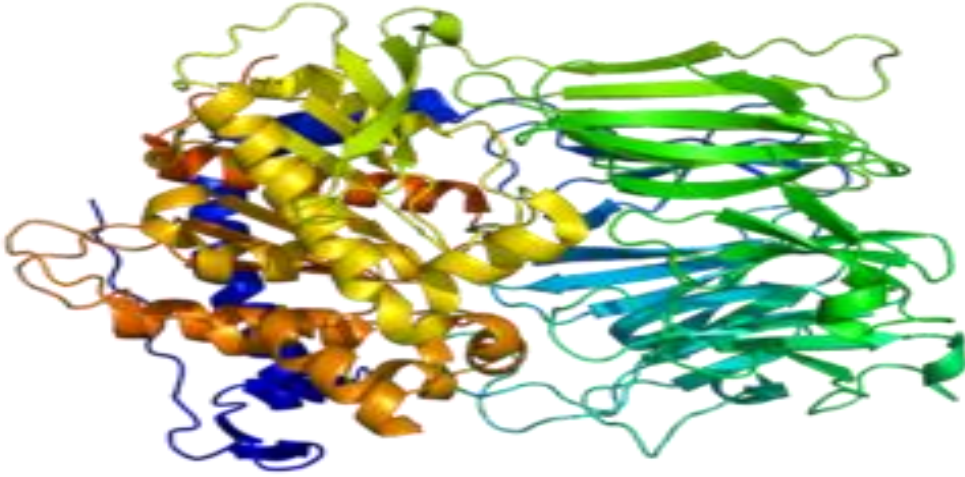
Gliadinler alkolde, gluteninler ise seyreltik asit içerisinde çözünürler. Sadece molekül içi disülfid bağları içeren gliadin, tek zincirli monomerik bir proteindir (Gänzle ve ark., 2008). Gliadinler, elektroforetik olarak moleküler ağırlıklarına göre α (alfa), β (beta), γ (gama) ve ω (omega) gliadinler olmak üzere dört ayrı gruba ayrılırlar (Shewry, 2009). Bunların hepsi çölyak hastalarında toksik etki gösterir (Erdil ve Ateş, 2005). Gliadinin zararlı etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Ulusoy ve ark., 2002). Molekül ağırlığı 30 000 ve 80 000 arasında olan gliadinler, sulu halde son derece yapışkandır. Hamurun önemli reolojik özelliklerinden olan viskoz akışı ve uzayabilirliği, gliadinler sağlar (Van der Borgh ve ark., 2005; Özüğür, 2011).

Gluteninler ise düşük molekül ağırlıklı (LMW) (30 000 ve 60 000 arasında) ve yüksek molekül ağırlıklı (HMW) (65 000 ve 90 000 arasında) altbirimlere ayrılır. Gluteninler çok zincirli, yüksek polimerik proteinlerdir ve molekül ağırlığı yaklaşık 80 000 ve birkaç milyon arasında değişmektedir. Bu nedenle hamurun uzamaya karşı direncinden yani elastikiyetinden sorumludur (Van der Borgh ve ark., 2005; Gänzle ve ark., 2008).

Gluten proteinleri yüksek oranda prolin içermeleri (toplam proteinin %14'ü) (Saldamlı ve Temiz, 2007) nedeniyle, gastrointestinal sistemde proteolitik yıkıma karşı oldukça dayanıklıdır. Ayrıca, transglutaminaz (TG) enzimi için de yüksek glutamin içeriği ile gluten, iyi bir substrattır (Catassi ve Fasano, 2008; Özüğür, 2011). Gluten, hamurun viskoelastik özelliklerinden sorumludur (İşleroğlu ve ark., 2009). Karakteristik özellikleri; yüksek kaliteli hamur hazırlanması için onu önemli bir bileşen yapmaktadır. Bu nedenle; fırıncılık endüstrisinde önemlidir. Mayalı fırın ürünlerinde, şekerlerin fermentasyonu sonucu oluşan CO₂ gazını tutarak, hamurun kabarmasını sağlamaktadır. Fırınlama sırasında gluten proteinlerinin denatüre olmasıyla hamur stabilize olmakta ve ürünün iç yapısı ve hacmi gelişmektedir (O'Neill, 2010). Glutenin hamur reolojisindeki bu işlevsel özelliği büyük moleküllü gliadinleri ve gluteninleri içermesinden kaynaklanmaktadır (Saldamlı ve Temiz, 2007). Glutamin ve prolin aminoasitleri ile zengin olan gluten proteinlerinin beslenmeyle alınmasıyla da, ince bağırsakta sindirime direnç göstermesi ile başlayan ve otoimmün bir bağırsak rahatsızlığı olan çölyak hastalığı ortaya çıkmaktadır (O'Neill, 2010).

2.5. Pep Enzimi

Prolil endopeptidaz (PEP), prolil oligopeptidaz (POP) olarak da bilinen prolinden sonrasını kesen insanlarda PREP geni tarafından kodlanan bir enzimdir (Vanhoof ve ark., 1994). PREP proteinin üç boyutlu yapısı Şekil 2.7 'de verilmiştir. İlk önce tavşan beyninin sitozolünde bir oligopeptidaz olarak tanımlanmış ve Pro-Phe bağındaki non-peptid bağına parçalamaktadır. PEP enzimi, alfa-melanosit uyarıcı hormon, anjiyotensin, nörotensin, oksitosin, P maddesi ve vazopresin gibi peptid hormonlarının ve nöropeptitlerin olgunlaşması ve parçalanmasında rol oynamaktadır. Aktivitesi, 10 kDa'dan daha az oligopeptitler üzerinde etkilidir ve prolinden önceki peptid bağı trans-konfigürasyonu için mutlak bir gereksinime sahiptir (Oliveira ve ark., 1976).



Şekil 2.7. PREP proteininin üç boyutlu yapısı (Homo sapiens (insan), NCBI)

Prolil endopeptidaz (PEP), proline özgü endoproteaz olup, EC 3.4.21.26 olarak da bilinir ve serin proteaz ailesine aittir, peptitlerin iç prolin kalıntılarını parçalama yeteneğine sahiptir (Walter ve ark., 1980). PEP yapısal ve fonksiyonel olarak, S9 peptidaz ailesinin alt üyeleri olan; dipeptidil peptidaz IV (EC 3.4.14.5), oligo peptidaz B (EC 3.4.21.83) ve acyl-aminoasil peptidaz (EC 3.4.19.1) ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle, bu enzim sınıfı gluteni parçalamak veya çölyak hastalarını tedavi etmek gibi potansiyel farmasötik ve diğer terapötik kullanım için (Stepniak ve ark., 2006; Mitea ve ark., 2008) kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bazı çalışmalarda, buğday ve arpa gluteninin bozulması incelenmiştir ve *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto ve ark., 1980) ve *Xanthomonas spp.* (Szwajcer ve ark., 1992), *Aeromonas hydrophilia* (Kanatani ve ark., 1993), *Sphingomonas capsulata* (Kabashima ve ark., 1998), *Halobacterium halobium* S9 (Capiralla ve ark., 2002), *Lactobacillus helveticus* (Sridhar ve ark., 2005), *Myxococcus xanthus* (Gass ve ark., 2005), *A. niger* (Edens ve ark., 2005; Lopez ve Edens, 2005; Xianchang ve ark., 2009) ve *Aspergillus oryzae* (Riggle ve Fisher, 2009) 'dan prolil endopeptidaz ekstrakte edilmiştir. Ancak, bunların toksik gluten peptitlerini parçalama yeteneği sadece in vitro koşullar altında bakılmıştır.

Janssen ve arkadaşları tarafından yapılan çok yeni bir çalışmada, farklı tipte gluten içeren bir dizi diyet takviyeleri, gluteni parçalayan enzimler ile buğdayın immünojenik gliadin peptitlerini parçalama yetenekleri açısından test edilmişlerdir. Bu enzim preparatlarının hiçbirisi, Hollanda'da sağlık, beslenme ve materyal alanlarında aktif çok

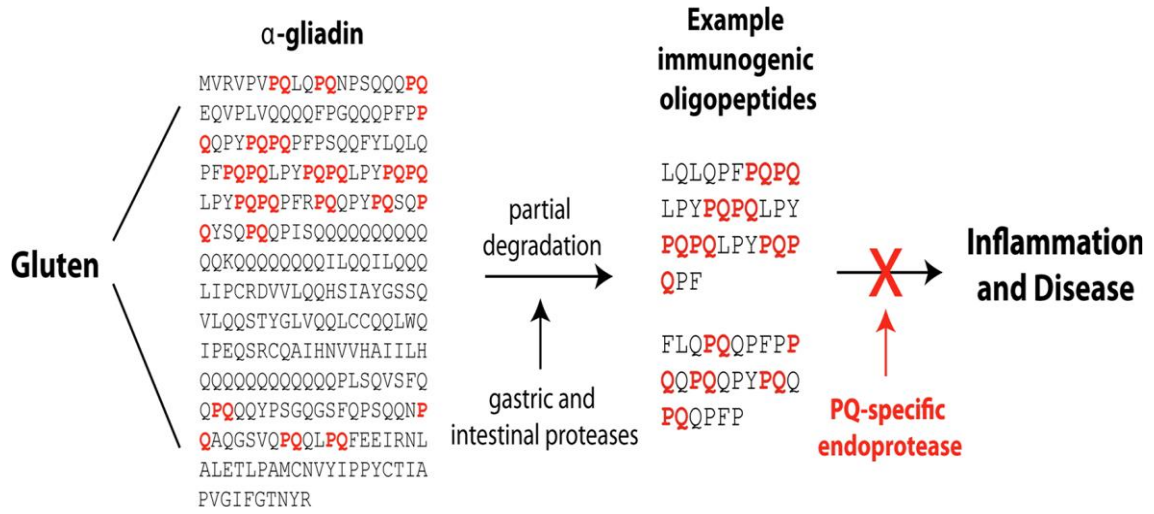
uluslu bir şirket olan DSM tarafından üretilen, *A. niger* Prolil Endopeptidaz (AN-PEP) hariç, diğerlerinin alerjenik peptitleri parçalayamadıkları görülmüştür (Janssen ve ark., 2015).

Prolil endopeptidaz, yaklaşık 30 aminoasit uzunluğundaki peptidler içindeki prolil aminoasitlerinin C-terminal tarafındaki peptid bağlarını kesen bir sitozolik prolil endopeptidazdır. Sadece kısa protein kalıntıları, bir geçit filtresi mekanizması görevi gören, farklı β tabakalı bölgesi nedeniyle prolil endopeptidazın aktif bölgesine girebilmektedir (Fülöp ve ark., 1998; Fülöp ve ark., 2000).

Değişmiş PREP aktivitesi, otizm spektrum bozuklukları, çeşitli şizofreni ve klinik depresyon gibi psikolojik hastalıklar ile de ilişkilidir (Momeni ve ark., 2005). Bununla birlikte, prolil endopeptidazın depresyon patofizyolojisinde oynadığı rol ile ilgili çelişkili bilgiler vardır; daha önceki çalışmalarda depresyon hastalarında enzimin azalan aktivitesi belgelenirken, ancak daha yeni çalışmalar aynı enzimin inhibisyonunun, depresif belirtilerinin hafiflemiş olduğunu göstermektedir (Maes ve ark., 1995; Khlebnikova ve ark., 2012).

Bazı prolil endopeptidaz türleri, gluten içeren buğday ürünlerinin, çölyak hastalığını şiddetlendirme eğilimini azaltmak için çalışmalarda kullanılmıştır (Stepniak ve ark., 2006). Birkaç prolil endopeptidaz inhibitörlerinde, nootropik ve antidepresan ilaçları olarak önerildiği bilinmektedir (Morain ve ark., 2007; Jarho ve ark., 2007; Kánai ve ark., 2008 ve Khlebnikova ve ark., 2009).

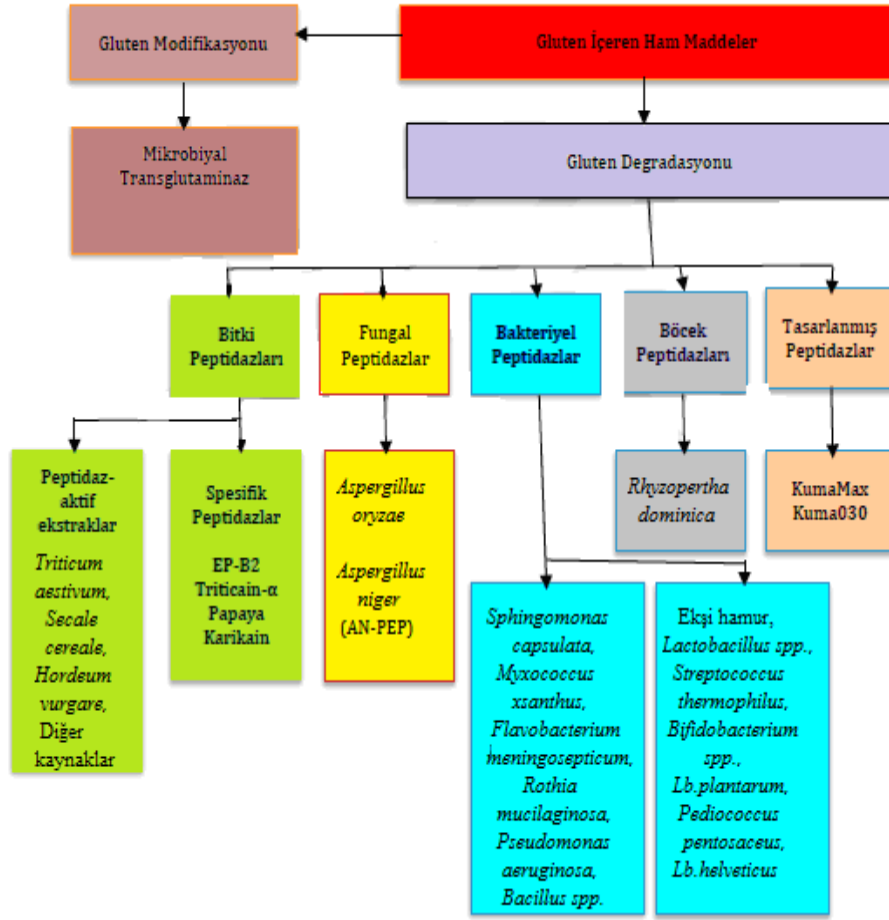
Çölyak hastalığının tedavisinde enzim terapötiklerinin rolünü gösteren şema Şekil 2.8 'de verilmiştir: Gluten α -gliadin de dahil birçok glikoproteinden oluşur. Enflamasyon ve hastalığa sebep olan α -gliadinin kısmi hidrolizi sonucunda oluşan bir PQ dipeptit proteaza dirençli peptittir. Midede fonksiyonel olan ve immünojenik peptitleri spesifik olarak parçalayabilen bir enzim, potansiyel olarak bu hastalık için bir terapötik olarak etki göstermektedir.



Şekil 2.8. Pep enziminin çalışma mekanizması (Gordon ve ark., 2012)

2.5.1. Pep enzim uygulamaları

Günümüzde, çölyak immünoreaktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla gluteni azaltmaya ya da modifiye etmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bitkilerden, özellikle gluten içeren tahıllar (*Triticum* sp., *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*) ve papayadan (*Carica papaya*); funguslardan *A. oryzae* (AO) ve *A. niger* (AN); bakterilerden *Sphingomonas capsulata* (SC), *Myxococcus xanthus* (MX), *Flavobacterium meningosepticum* (FM), *Rothia mucilaginosa* (RM), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. ve daha az miktarda da tahıl zararlısı *Rhizopertha dominica* gibi böceklerden gluteni parçalayabilen enzimler elde edilmiştir. Ayrıca, Kumamax ve Kuma030 olarak bilinen enzimler, Rosetta Moleküler Modelleme tarafından *Alicyclobacillus sendaiensis*'ten As-kumamolisin endopeptidazı tasarlanmıştır (Şekil 2.9) (Scherf ve ark., 2018).



Şekil.2.9. Gluten degradasyonu veya gluten modifikasyonu için enzim kaynakları (Scherf ve ark., 2018; Şahin, 2019)

Genel olarak peptidazlar (EC 3.4), hidrolazlar (EC 3) sınıfına aittir ve peptit bağlarını hidrolize ederler. Ekzopeptidazlar sadece polipeptit zincirlerinin sonunda, oysa endopeptidazlar polipeptit zincirleri arasında hareket eder ve bu da onları gluten parçalanmasında daha etkili hale getirir. Endopeptidazlar, katalitik mekanizmasına göre, serin endopeptidazlar (EC 3.4.21), sistein endopeptidazlar (EC 3.4.22), aspartik endopeptidazlar (EC 3.4.23), metalloendopeptidazlar (EC 3.4.24) ve treonin endopeptidazlar (EC 3.4.25) olarak bilinen alt bölümlere ayrılmaktadır (Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Birliği Biyoloji, 2016). Gluteni parçalayan peptidazlar; ya karışımlar (örneğin; arpa malt ekstraktı) (Knorr ve ark., 2016), ya saflaştırılmış ekstraktlar (örneğin; AN-PEP) (Stepniak ve ark., 2006) ya da EP-B2 gibi rekombinant

ekspresyon ile elde edilmişlerdir (Gass ve ark., 2006). Alternatif olarak, *Lactobacillus spp.* içeren ekşi hamur fermentasyonu kullanılmıştır (Di Cagno ve ark., 2002).

Fungal peptidazdan, özellikle AN-PEP'in, pH 2-8 aralığında çalıştığı, optimum pH'sı 4-5 olup, mide asiditisine dayanabilmekte ve pH 8.0 değerinde de aktivitesinin %20'sini koruyabilmektedir (Loponen, 2006). Montserrat ve arkadaşları yaptıkları tıbbi bir çalışmada, oral AN-PEP enzim ilavesinin glutensiz diyetin yerini alamayacağını, ancak yanlışlıkla gluten tüketimi olduğunda sindirimi destekleyeceğini belirtmişlerdir (Montserrat ve ark., 2015). Yapılan diğer tıbbi çalışmalarda, *Flavobacterium meningosepticum* ve *capsulata*'den elde edilen PEP ile arpadan elde edilen EP-B2'de de, glutenin bozunmasına yönelik olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Matysiak ve ark., 2005; Gass ve ark., 2007). Fakat bu çalışmalar düşük mide pH'sında sınırlı kalmıştır. Ayrıca, glutenin onikiparmak bağırsağına ulaşmadan tamamen parçalanması için enzimin yüksek konsantrasyonları gerekmektedir (Schuppan ve Junker., 2007).

Teknolojik yapılan çalışmalarda ise, buğday, arpa, çavdardan elde edilen ürünlerde, AN-PEP kullanımı ile gluten miktarı 20 ppm'in altına düşürülmüştür (Guerdrum ve Bamforth., 2012; Walter ve ark., 2014; Walter ve ark., 2015; Knorr ve ark., 2016).

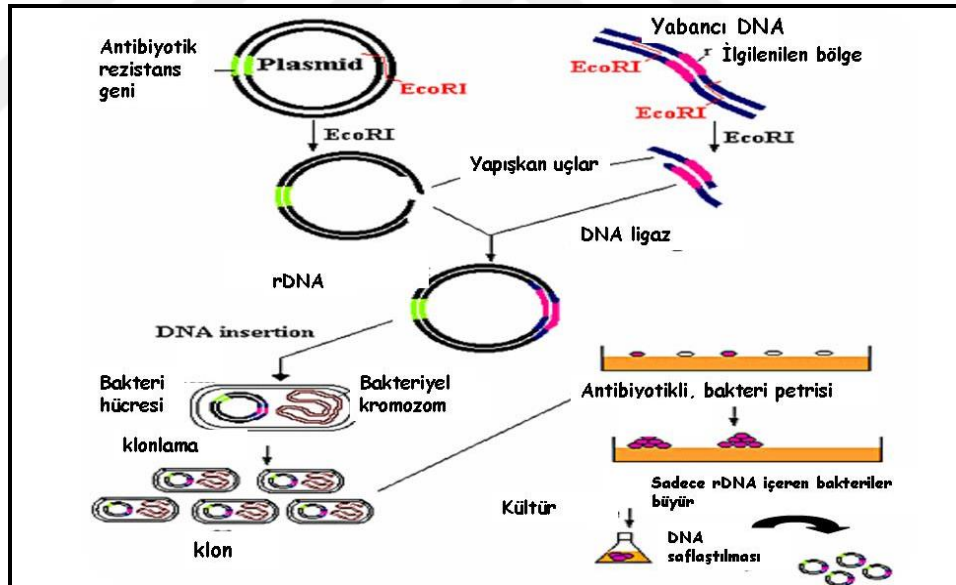
Walter ve arkadaşları (2014), çimlenmiş ve çimlenmemiş buğday kepeğini ve ekmek içeceğini (bread drink) AN-PEP çözeltisi ile muamele etmişlerdir (Walter ve ark., 2014). 5 g buğday kepeğine, 50 µL AN-PEP (400 mg/mL) çözeltisi ve 20 mL saf su ilave ederek, 24 ve 48 saat inkübe etmişlerdir. Çimlenmemiş buğday kepeğindeki gluten derişimi 107 285 ppm'den 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda sırasıyla 127 ppm ve 5 ppm'e düşmüştür. Başlangıç gluten derişimi 5335 ppm olan çimlenmiş buğday kepeğinde 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda ölçülen gluten derişimi sırasıyla 16 ppm ve ölçüm limitinin altında tespit etmişlerdir. 5 mL ekmek içeceğine (0.1-10 mg/mL derişimler), hazırlanan AN-PEP çözeltisinden 50 µL ilave ederek 0-30 dakika inkübe etmişlerdir. Başlangıç gluten derişimi 82.5 ppm olan ekmek içeceğinin gluten derişimini 10 dakika inkübasyon sonunda 20 ppm'in altında bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada çavdar ununu 500 mg/mL derişimde hazırlanan AN-PEP çözeltisiyle muamele etmişlerdir. Başlangıçta 56 173 ppm olan gluten derişimi 48 saat inkübasyon sonunda 20 ppm'in altına düşmüştür (Walter ve ark., 2015; Şahin, 2019).

2.6. Rekombinant DNA Teknolojisi

2.6.1. Rekombinant DNA teknolojinin temelleri

Rekombinant DNA üretiminde, (gen klonlanmasında) önemli olan aşamalar aşağıdaki şekil 2.10' daki gibidir.

- Hedef DNA'nın (veya RNA) saf olarak elde edilmesi,
- Hedef genin PCR ile çoğaltılması,
- Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi,
- Vektör DNA'sı ile gen DNA'sının birleştirilmesi (Ligasyon),
- Oluşan rekombinant vektörün hedef hücreye transformasyonun yapılması,
- Seleksiyon,
- Oluşturulan rekombinant vektörün kontrol edilmesi (Arda, 2000).



Şekil 2.10. Plazmid kullanarak gen klonlanması ve rekombinant DNA eldesi (Anonim, 2019)

2.6.2. Hedef DNA'nın (veya RNA) elde edilmesi

Klonlamanın ilk aşaması, istenilen gen ürününü kodlayan geni içeren prokaryotik (veya ökaryotik) hücre genomunun (DNA veya RNA) saf ve yüksek miktarda elde edilmesi veya genin sentezlettilerilerek alınmasıdır DNA kendine özgü kimyasal ve fiziksel

özelliklere sahip olması nedeniyle diğer hücre bileşenlerinden kolay ve saf bir şekilde ayrılabilir. Ayrıca, gen bankaları aracılığıyla optimize edilmiş yapay gen sentezi de yaptırılabilir (Arda, 2000).

2.6.3. Hedef genin PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltılması

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile DNA'nın hedeflenen bölgesinin milyonlarca kopyası oluşturulabilmektedir. PCR ile DNA'nın çoğaltılabilmesi için reaksiyon karışımında çoğaltılacak olan kalıp DNA; bu DNA'da çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp, ona bağlanacak olan primerleri; primerlere bağlanıp bunlara 3'ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz enzimi; sentezde kullanılacak deoksinükleotit trifosfatlar; polimerazın çalışması için gerekli tampon görevi yapacak malzemeler, tuzlar ve enzimin çalışması için önemli bir kofaktör olan Mg^{+2} iyonları gerekir (Arda, 2010).

2.6.4. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim

Restriksiyon enzimleri, bir bakterinin kendine özgü DNA'yı kesmezken yabancı bir DNA'yı tanıdığı ve onu belirli bölgelerden kestiğinin anlaşılması ile keşfedilmiştir. Bakterinin kendi DNA'sı bazı özgün bazlara (A ve C) metil grubu bağlanarak modifiye edildiğinden restriksiyon enzimleri tarafından hidrolizlenememektedir. Restriksiyon enzimleri DNA içerisindeki belirli bir diziyi tanır ve bu bölge modifiye olmamış ise buradaki fosfodiester bağını hidrolizlerler (Sultuybek ve ark., 1995). DNA'yı kesebilen bu enzimlerin isimlendirilmesi izole edildikleri bakteriler temel alınarak yapılır (Çizelge 2.4).

Kesim sonucunda DNA uçlarında birbirine komplementer nükleotitler ortaya çıkar. Bu uçlara genellikle komplementer ya da yapışkan uç denir. Bazı enzimler ise DNA'nın her iki iplikçliğini aynı noktada kestiği için herhangi bir yapışkan uç ortaya çıkmamaktadır. Bu tip uçlara küt (blind) uç denir (Sultuybek ve ark., 1995).

Restriksiyon enzimleri ile kesilme sonucu DNA'nın 5' ucunda fosfat grubu, 3' ucunda bir hidroksil grubu ortaya çıkar. Hazırlanan genomik DNA segmentleri ile vektör DNA'sı birleşecek duruma getirilir.

Vektörlerde bulunan, spesifik antibiyotik dirençlilik markerleri (amp^r, kan^r, tet^r, lac⁺, vs.) sayesinde, istenilen geni taşıyan kolonileri tespit etmeyi sağlar. Doğal plazmidler yerine, suni plazmidlerden klonlamada daha çok yararlanılır.

Çizelge 2.4. Bazı restriksiyon enzimleri (Bardakcı ve ark., 2009)

Enzim	Organizma	Tanıma Bölgesi
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	G↓AATTC
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G↓GATCC
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	A↓GATCT
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenza</i>	A↓AGCTT
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	CTGCA↓G
<i>SalI</i>	<i>Streptomyces albus</i>	G↓TCGAC
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	CCC↓GGG
<i>HpaI</i>	<i>Haemophilus parainfluenza</i>	GTT↓AAC
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	T↓CGA
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenza</i>	G↓ATC

2.6.5. Gen DNA'sının vektör DNA'sı ile birleştirilmesi (ligasyon)

Saf olarak hazırlanan genomik DNA segmentleri ile vektör DNA (eğer plazmid ise) 16°C'de birlikte 3-5 dakika inkübasyona bırakılır. Böylece, karşılıklı yapışkan uçların birleşmesi, DNA ligaz enzimi ilavesi ile sağlanır. DNA ligaz enzimi bu işlevini, DNA'nın bir ucundaki 5'-P (fosfat) ile diğer DNA'nın 3'-OH ucu arasında fosfodiester bağları kurarak gerçekleştirir. Bu işlem sonunda birleşen moleküller (rekombinant plazmid) oluşabileceği gibi resirkülarizasyon nedeniyle birleşmeyen genomik DNA segmentleri ve plazmid DNA'sı da meydana gelebilecektir. Ayrıca, plazmidle sadece genomik DNA segmenti değil, ortamda çok sayıda bulunan diğer genleri taşıyan veya taşımayan ve uygun uzunluktaki segmentler de birleşebilirler (Nelson ve Cox, 2005).

2.6.6. Oluşan rekombinant vektör DNA'nın alıcı hücreye aktarılması

Genomik DNA ve vektör birleşmesinden oluşan konjugat, belirli miktarda konakçı kompetant *E. coli* ile birlikte bırakıldıktan sonra 42°C'de ısı şokuna maruz bırakılarak transformasyon işlemi gerçekleştirilir. Kompetan hücre hazırlamak için uygun şekilde yetiştirilmiş *E. coli* bakteri hücreleri içinde uygun tuzlar ve Ca^{+2} iyonları bulunan steril bir kaba transfer edilerek bir miktar bekletilir bu esnada ortamda bulunan $CaCl_2$ *E. coli* 'nin yüzeyini, sirküler plazmid DNA'sı için geçirgen hale getirir ve rekombinant plazmid kolayca bakteriye geçebilir (transformasyon) (Arda, 2000).

2.6.7. Seleksiyon

Hedef geni taşıyan plazmidin aktarıldığı *E. coli* kolonilerini diğerlerinden ayırmak, gen aktarma tekniğinin en önemli bir aşamasını oluşturur. Ampisilin, kanamisin gibi, antibiyotiklere direnç genlerini birçok plazmit içermektedir. Rekombinant plazmitlerin seçimi, besi ortamına eklenen, bu antibiyotik direnç genleri sayesinde olacaktır (Kaplan ve ark., 2002).

2.6.8. Klonlamanın doğrulanması

Klonlama işleminin doğruluğu günümüzde temel olarak üç yolla yapılmaktadır. Bunlar PCR analizi, plazmit DNA'ların restriksiyon doğrulama kesimi yapılması ve DNA'nın dizi analizinin yapılmasıdır. PCR analizi yapılarak hızlı bir şekilde klonlama işleminin doğruluğuna bakılabilir. Yapılan PCR ürünü doğrudan agaroz jel elektroforezinde koşularak rekombinant plazmitin doğrulanmasına bakılır. Klonlamanın doğrulamasını tam olarak kesinleştirmek için, elde edilen rekombinant plazmid DNA'nın dizi analizinin yapılması gerekir (Sambrook ve ark., 1989).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Donanımlar

Tez çalışmalarında faydalanılan donanımlar ve bunların üreticileri Tablo 3.1.'de yer almaktadır.

Tablo 3.1. Donanımlar ve üreticileri

Donanım	Üretici
50L otoklav	HMC HIRAYAMA
Bio TDB100 Termostatlı Blok Isıtıcı	BIOSAN
Buzdolabı	VESTEL GTP 455A
Çalkalayıcı İnkübatör	BIOSAN ES 20
Çalkalayıcı İnkübatör	ZHICHENG - ZHWY111C
Dikey Soğutucu +4°C	UĞUR
Eksi 80 dondurucu	HETTICH
Etüv	MEMMERT
Güç kaynağı	BIORAD
Isıtıcı Magnetik Karıştırıcı	VELP SCIENTIFICA ARE
Kar makinesi	VISION
MD ₅₀₀ mikrodalga fırın	ARÇELİK
Mikro 22R santrifüj	HETTICH
Sonikatör	SONICS (VCX130)
Spin Cihaz	BIOSAN, Combi Spin FVL 2400N
UV Gösterici	SYNGENE SYTC/1422
UV/VIS Spektrofotometresi	VARIAN CARRY 50
Yüksek Hızlı Santrifüj	VISION VS 30 000i

3.1.2. Kimyasallar

Tez çalışmalarında kullanılan kimyasal ve bunların üreticileri Tablo 3.2’ de yer almaktadır.

Tablo 3.2. Kimyasallar

Kimyasallar	Üretici
Agar	BD Bacto™ Agar
Agaroz	Sigma Aldrich
Akrilamid	Amresco
Ampisilin	Sigma Aldrich
APS	Biorad
<i>Bam</i> HI	Takara
Beta Merkaptotanol	Carlo Erba
Bezamidin	Merck
BSA	Promega
CaCl ₂ .2H ₂ O	Carlo Erba
Dietilen Glikol	Sigma
DMSO	Merck
DTT	Bio Basic
<i>Eco</i> RI	Takara
Etanol	Merck
Gliserol	VWR
HCl	Merck
IPTG	Amresco
İmidazol	Merck
Jelden DNA izolasyon kiti	Geneaid
KCH ₃ COO	Merck
KCl	Sigma
Kloramfenikol	Sigma
LB Broth Base	Invitrogen lennox L Broth Base

Tablo 3.2. (Devamı) Kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Markası
Metanol	Merck
NaH ₂ PO ₄	Carlo Erba
<i>Nde</i> I	Takara
PCR Master Mix	Thermo Scientific
Plazmit DNA saflaştırma kiti	Geneaid
PMSF	Sigma Aldrich
SDS	Serva
TEMED	Biorad
Trypton	BD Bacto™
Tris	Sigma Aldrich
Vital buğday gluteni	Doğalsan
<i>Xho</i> I	Takara
Z-Gly-Pro-Pna	Sigma

3.1.3. Çözeltiler

Aşağıda hazırlanma detayları yer alan solüsyonlar tez çalışmalarında kullanılmışlardır.

FSB Solüsyonu: 100 g gliserol, 7.5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mL 1 M (pH:7.5) KCH_3COO , 7.4 g KCl alındı, pH değeri 6.5 olarak ayarlandı ve toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak otoklavlama işlemi yapıldı.

PİPES'li Tampon Solüsyonu: KOH ile pH değeri 6.8' e getirilen 0.5 M, 50 mL PİPES solüsyonunun 20 mL'si suda çözündürülen 18.64 g KCl, 6.92 g MnCl_2 ve 1.66 g CaCl_2 980 mL karışımına ilave edildi. Hacim 1 L'ye tamamlandıktan sonra 0.45 μm 'lik filtreden geçirildi, steril stok şişelerine bölündü ve -20°C 'de muhafaza edildi.

Sitrik asit- Na_2HPO_4 (McIlvaine) tamponu farklı pH değerlerinde hazırlanmış olup bu tamponlar aşağıda yer almaktadır:

pH:2.2: 400 μL 0.2 M Na_2HPO_4 ve 19.6 mL 0.1 M sitrik asit solüsyonu karıştırıldı.

pH:3: 4.11 mL 0.2 M Na_2HPO_4 ve 15.89 mL 0.1 M sitrik asit solüsyonu karıştırıldı.

pH:4: 7.71 mL 0.2 M Na_2HPO_4 ve 12.29 mL 0.1 M sitrik asit solüsyonu karıştırıldı.

pH:5: 10.3 mL 0.2 M Na_2HPO_4 ve 9.7 mL 0.1 M sitrik asit solüsyonu karıştırıldı.

pH:6: 12.63 mL 0.2 M Na_2HPO_4 ve 7.37 mL 0.1 M sitrik asit solüsyonu karıştırıldı.

pH:7: 16.47 mL 0.2 M Na_2HPO_4 ve 3.53 mL 0.1 M sitrik asit solüsyonu karıştırıldı.

pH:8: 19.45 mL 0.2 M Na_2HPO_4 ve 0.55 mL 0.1 M sitrik asit solüsyonu karıştırıldı.

Tris-HCl tamponu (0.1 M pH:9): Yaklaşık 10 mL saf suda çözündürülen 0.24 g Tris'in pH değeri 1 M HCl ile 9'a ayarlandı ve saf suyla toplam hacmi 20 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl tamponu (0.1 M pH:10): Yaklaşık 10 mL saf suda çözündürülen 0.24 g Tris'in pH değeri 1 M HCl ile 10'a ayarlandı ve saf suyla toplam hacmi 20 mL'ye tamamlandı.

IPTG: 1.5 gram IPTG tartıldı, 15 mL steril suda çözülterek steril 0.2 μm 'lik filtreden geçirildi, mikrotüplere bölündü ve -20°C 'ye saklandı.

Kloramfenikol Solüsyonu: Öncelikle mutlak etanolde kloramfenikol 34 mg/mL olacak şekilde çözüldü daha sonra filtreden (0.2 µm'lik) geçirilerek steril edildi.

Ampisilin Antibiyotiği: 1.5 gram ampisilin tartılarak 15 mL saf suda çözüldü. Daha sonra steril mikrotüplere bölmek için 0.2 µm'lik filtreden geçirildi ve -20°C'de depolandı.

LB Solüsyonu: 1 L suda çözündürülen 20 g LB (Luria-Bertani) Broth Base'li solüsyondan 1 L alındı ve 250'şer mL olacak şekilde iki tane stok şişesine konuldu, 3.75 g agar ilave edilip karıştırılarak otoklavlandı. Kalan LB solüsyonu erlenlere 50 mL ve deney tüplerine 4 mL miktarlarında konularak ağzıları çok küçük açık kalmak şartıyla alüminyum folyo ile kapatıldı ve otoklavlandı (LB: 10 g tripton, 10 g tuz ve 10 g yeast ekstrakt)

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Elektroforez Jeli: SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezinde aşağıdaki solüsyonlar kullanılmıştır.

Alt Tampon: pH değeri 8.8 olarak ayarlanmak üzere 4 g SDS (%0.4) ve 182 g Tris (1.5 M), 1 L saf suda çözüldü.

Üst Tampon: pH değeri 6.6 olarak ayarlanmak üzere 4 g SDS (%0.4) ve 60.5 g Tris 1.5 M 1 L saf suda çözüldü.

Yürütme Jeli: 2.7 mL %40 akrilamid, 4 mL su, 2.25 mL alt tampon, 20 µL TEMED ve 50 µL %10 APS.

Yükleme Jeli: 0.35 mL %40 akrilamid, 2.55 mL su, 1 mL üst tampon, 10 µL TEMED ve 50 µL %10 APS .

Kasete dökülme aşamasında bütün maddeler konuldu ve en son TEMED ilave edildi. Yürütme jelinin polimerleşme aşamasında yükleme jeli üzerine döküldü ve bu aşamanın tamamlanması beklendi.

Elektroforez Tamponu (1X): 1 g SDS, 14.4 g Glisin, 3 g Tris bileşiklerinin üzerine saf su konularak toplam hacimleri 1 L yapıldı.

SDS Örnek Yükleme Tamponu (5X): 1000 µL %1'lik Bromfenol mavisi, , 5 mL gliserol (%50), 2 mL %10'luk SDS, 0.5 mL β-ME (β- Merkaptotanol), 0.6 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8) ve 0.9 mL saf su karıştırıldı.

SDS Jel boyama (Staining) Solüsyonu: 450 mL metanol içerisinde 0.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 çözüldükten sonra filtre kâğıdından geçirildi, üzerine 450 mL saf su ve 100 mL asetik asit eklendi.

Destaining Solüsyonu: 800 mL saf su, 100 mL asetik asit ve 100 mL metanol karışım haline getirildi.

Amonyum Persülfat (APS-%10): 5 mL saf su içerisinde 0.5 g APS çözüldürüldü.

Afinite Kromatografisiyle Safılaştırmada Kullanılan Çözeltiler:

NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponu: pH değeri 8.0'e ayarlanmak üzere, 0.2 M 435 mL Na₂HPO₄ ve 65 mL 0.2 M NaH₂PO₄ karıştırıldıktan sonra toplam hacim 1 L'ye saf su ile tamamlandı.

Yükleme Tamponu: 2.92 g NaCl 500 mL NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponunda (pH:8.0) çözüldü.

Tris Tamponu: Bir miktar su içinde 12.12 g tris çözüldü, pH değeri derişik HCl kullanılarak 7.5'a ayarlandı ve 2.92 g NaCl eklendi. Hacim su ile 1 L'ye tamamlandı.

Yıkama Tamponu: 25 mM imidazol 100 mM NaCl-100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH:8.0): 0.85 g imidazol, 2.92 g NaCl 500 mL NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponunda (pH:8.0) çözüldü.

300mM imidazol Tris/HCl Tamponu: 2.04 g imidazol 100 mL Tris/HCl tamponu içinde çözüldü ve pH değeri derişik HCl kullanılarak 7.5'a ayarlandı.

Elüsyon Tamponu: 300 mM imidazol 100 mM NaCl-100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH:8.0): 10.2 g imidazol, 2.92 g NaCl 500 mL NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponunda (pH:8.0) çözüldü.

Refolding (Yeniden Katlanma) için Kullanılan Çözeltiler:

I. Protokol için kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir:

Yeniden Katlanma Tamponu: Saf su içerisinde 100 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, %20 gliserol (pH:8.0) olmak üzere çözüldü.

Süspansiyon Tamponu: Saf su içerisinde 1 mM DTT ,50 mM Tris-HCl (pH:8.0) çözüldü.

Diyaliz Çözeltisi: Saf su içerisinde Diyaliz Çözeltisi için, 100 mM NaCl içeren 20 mM Tris HCl (pH:8.0) olmak üzere çözüldü.

Çözme Tamponu: Saf su içerisinde 50 mM Tris-HCl (pH:8.0) 8 M Üre (pH:8.0) olmak üzere çözüldü.

Resüspansiyon Tamponu: Saf su içerisinde %2.5 triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH:8.0), %20 süktroz çözüldü.

II. Protokol için kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir:

Bağlama Tamponu: Saf su içerisinde 5 mM imidazol, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 6 M guanidin hidroklorür, 1 mM 2-merkaptoetanol pH:8.0 olmak üzere çözüldü.

Yıkama Tamponu: Saf su içerisinde 20 mM imidazol, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 6 M üre, 1 mM 2-merkaptoetanol pH:8.0 olmak üzere çözüldü.

Yeniden Katlanma (Refolding) Tamponu: Saf su içerisinde 20 mM imidazol, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM 2-merkaptoetanol pH:8.0 olmak üzere çözüldü.

Elüsyon Tamponu: Saf su içerisinde 500 mM imidazol, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM 2-merkaptoetanol pH:8.0 olmak üzere çözüldü.

3.2. Yöntem

3.2.1. Proteini kodlayan genin nükleotid dizisinin tasarımı

PEP enziminin üretimi için gerekli olan DNA dizisine literatür ve biyoinformatik çalışmalar yapılarak NCBI sitesinden ulaşılmıştır (Aksesyon numarası: AX458699.1). Klonlama vektörü olarak pET22b vektörü seçilmiştir (Şekil 3.1) ve NCBI’den alınan gen dizisine *E. coli* K12 suşu için biyoinformatik araçlar kullanılarak kodon optimizasyonu yapılmıştır. Kodon optimizasyonu çalışmalarında PEP geninin nükleotid sekansında bulunan ve *E. coli* K12 mikroorganizmasında düşük sıklıkla ifade edilen kodonlar, daha yüksek sıklıkla ifade edilen kodonlarla yerleri değiştirilmiştir. Kodon optimizasyonu için jCat kodon optimizasyon programı kullanılmıştır (<http://www.jcat.de/>). “CLUSTAL Omega(1.2.1) Multiple Sequence Alignment” programı kullanılarak, DNA hizalama işlemi yapılmıştır.

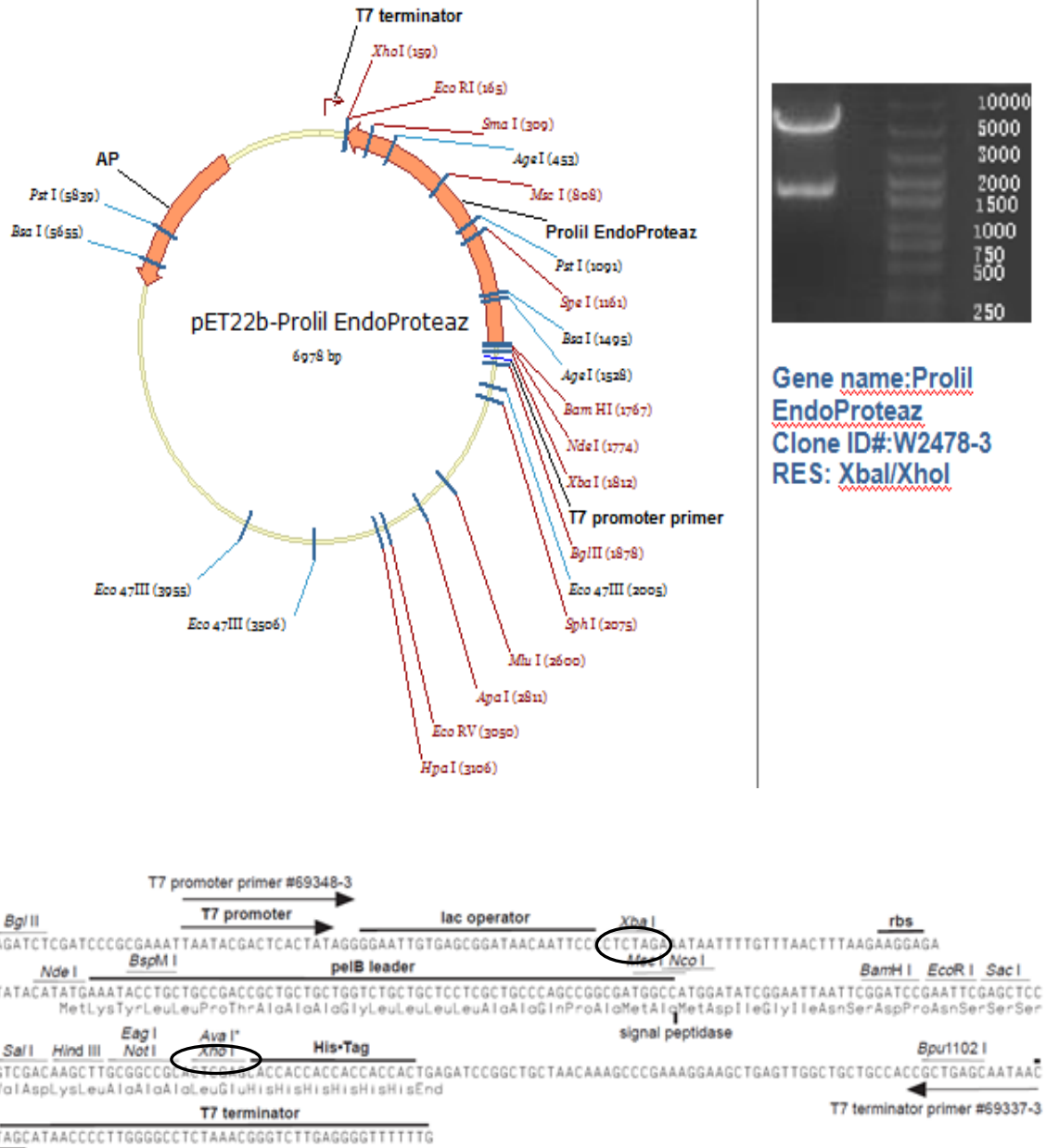
Klonlama işlemlerini kolaylaştırmak için ve B planı olarak başka vektörlere de geni klonlamak için dizinin başına *NdeI* ve *BamHI*, dizinin sonuna *EcoRI* ve *XhoI* restriksiyon enzim kesim bölgesi eklenmiştir. B planı olarak çalışmanın devamında primerler tasarlanarak laboratuvarında bulunan diğer vektör sistemlerine de klonlama yapma olanağı sağlayabilmesi açısından önemlidir. Ek olarak nükleotid dizisi üretilen proteinin kolaylıkla saflaştırılmasını sağlamak için 6 Histag nükleotid dizisi eklenmiştir. Biyoinformatik araçlarla düzenlenen gen dizisi (Çizelge 3.2.) Biomatik firmasına sentez ettirilmiştir.

Çizelge 3.1. *A.niger*'e ait Pep proteinine ait optimize edilmiş nükleotid dizisi ve kodladığı aminoasit dizisi

Atg	gga	tcc	cgt	gcc	ttc	tcc	gct	gtc	gct	gct	gcg	gcc	ctg	gcg	ctc	tct	tgg	
M	G	S	R	A	F	S	A	V	A	A	A	A	L	A	L	S	W	
gcg	tct	ctg	gct	cag	gct	gct	cgc	ccc	cgt	ctt	gtg	ccc	aag	cct	gtc	tct	cgg	cca gcc
A	S	L	A	Q	A	A	R	P	R	L	V	P	K	P	V	S	R	P A
tct	agt	aaa	tcg	gct	gcg	acc	acg	ggc	gag	gct	tac	ttt	gag	cag	ctg	ctg	gac	cat cat
S	S	K	S	A	A	T	T	G	E	A	Y	F	E	Q	L	L	D	H H
aat	ccg	gag	aag	ggc	acc	ttt	tcc	cag	agg	tac	tgg	tgg	agt	act	gaa	tac	tgg	ggt ggt
N	P	E	K	G	T	F	S	Q	R	Y	W	W	S	T	E	Y	W	G G
cct	ggg	tca	ccg	gtc	gtc	ctc	ttt	act	cct	gga	gag	gtc	tct	gcg	gat	ggc	tat	gag ggg
P	G	S	P	V	V	L	F	T	P	G	E	V	S	A	D	G	Y	E G
tat	ctc	acc	aat	ggg	act	ctc	act	ggt	gtc	tat	gcg	cag	gag	atc	cag	ggt	gcc	gtc att
Y	L	T	N	G	T	L	T	G	V	Y	A	Q	E	I	Q	G	A	V I
ctc	att	gag	cac	cgc	tac	tgg	ggt	gat	tct	tct	cct	tat	gag	gtg	ctc	aat	gcc	gaa act
L	I	E	H	R	Y	W	G	D	S	S	P	Y	E	V	L	N	A	E T
ctt	cag	tac	ctc	aca	ctg	gac	caa	gcc	att	ctg	gac	atg	acc	tac	ttc	gcg	gag	acg gtg
L	Q	Y	L	T	L	D	Q	A	I	L	D	M	T	Y	F	A	E	T V
aag	ctg	caa	ttc	gat	aac	agc	acc	cgc	agc	aat	gcg	cag	aat	gct	ccc	tgg	gtc	atg gtc
K	L	Q	F	D	N	S	T	R	S	N	A	Q	N	A	P	W	V	M V
ggt	gga	tca	tac	agt	ggt	gcc	ttg	acg	gct	tgg	acc	gaa	tct	gtc	gcg	cct	gga	acg ttc
G	G	S	Y	S	G	A	L	T	A	W	T	E	S	V	A	P	G	T F
tgg	gct	tac	cat	gcg	act	agt	gct	cct	gtg	gag	gct	atc	tac	gac	tat	tgg	caa	tac ttt
W	A	Y	H	A	T	S	A	P	V	E	A	I	Y	D	Y	W	Q	Y F
tac	ccc	atc	cag	caa	ggt	atg	gca	cag	aac	tgc	agc	aag	gac	gtg	tct	ctg	gta	gcc gag
Y	P	I	Q	Q	G	M	A	Q	N	C	S	K	D	V	S	L	V	A E
tat	gtc	gat	aaa	att	gga	aag	aac	gga	act	gcc	aag	gag	cag	cag	gca	ctc	aag	gaa ttg
Y	V	D	K	I	G	K	N	G	T	A	K	E	Q	Q	A	L	K	E L
ttt	ggt	ctg	gga	gct	gtt	gag	cat	ttt	gat	gac	ttt	gcc	gct	gtc	ctc	ccc	aac	gga ccg
F	G	L	G	A	V	E	H	F	D	D	F	A	A	V	L	P	N	G P
tac	ctc	tgg	caa	gac	aac	gac	ttt	gcc	acg	gga	tac	tct	tcc	ttc	ttc	cag	ttc	tgt gac
Y	L	W	Q	D	N	D	F	A	T	G	Y	S	S	F	F	Q	F	C D
gcc	gtc	gag	ggt	gtc	gaa	gcg	ggc	gcg	gca	gta	acc	ccc	ggc	ccc	gag	ggt	gtc	ggc ctc
A	V	E	G	V	E	A	G	A	A	V	T	P	G	P	E	G	V	G L
gaa	aag	gcc	ctg	gcc	aac	tac	gca	aac	tgg	ttc	aat	tca	acc	att	ctc	cct	gat	tac tgc
E	K	A	L	A	N	Y	A	N	W	F	N	S	T	I	L	P	D	Y C
gca	agc	tac	ggc	tac	tgg	acc	gac	gaa	tgg	agc	gtc	gcc	tgc	ttc	gac	agc	tac	aac gcc
A	S	Y	G	Y	W	T	D	E	W	S	V	A	C	F	D	S	Y	N A
tct	agc	ccc	atc	tac	acc	gat	acc	tcc	gta	ggc	aat	gcg	gtc	gat	cgc	caa	tgg	gaa tgg
S	S	P	I	Y	T	D	T	S	V	G	N	A	V	D	R	Q	W	E W
ttc	ctc	tgc	aac	gag	cct	ttc	ttc	tac	tgg	cag	gac	ggt	gct	ccc	gag	ggc	acc	tcc acc
F	L	C	N	E	P	F	F	Y	W	Q	D	G	A	P	E	G	T	S T
att	gtg	ccc	cga	ctc	gtc	agc	gcg	tcc	tac	tgg	caa	cgg	caa	tgt	ccg	ctc	tac	ttc ccc
I	V	P	R	L	V	S	A	S	Y	W	Q	R	Q	C	P	L	Y	F P
gaa	acg	aac	ggc	tac	acg	tac	ggc	agc	gag	ggt	aag	aac	gcc	gag	acg	gtg	aac	agc
E	T	N	G	Y	T	Y	G	S	A	K	G	K	N	A	A	T	V	N S
tgg	acc	ggt	gga	tgg	gat	atg	acc	cgc	aac	acg	acg	cgg	ttg	atc	tgg	acg	aac	ggg caa
W	T	G	G	W	D	M	T	R	N	T	T	R	L	I	W	T	N	G Q
tat	gac	ccc	tgg	cgg	gac	tcc	ggt	gtg	tct	agc	act	ttc	cgg	ccc	ggt	gga	ccg	ctg gcg
Y	D	P	W	R	D	S	G	V	S	S	T	F	R	P	G	G	P	L A
agc	acg	gcg	aat	gaa	ccc	gtg	cag	att	atc	ccg	ggc	gga	ttc	cat	tgc	tcg	gat	ttg tat
S	T	A	N	E	P	V	Q	I	I	P	G	G	F	H	C	S	D	L Y
atg	gcg	gat	tat	tat	gcg	aat	gag	ggg	gtt	aaa	aag	gtg	gtg	gat	aat	gag	gtg	aag cag
M	A	D	Y	Y	A	N	E	G	V	K	K	V	V	D	N	E	V	K Q
atc	aaa	gag	tgg	gtg	gag	gag	tat	tat	gcc	cac	cac	cac	cac	cac	cac	cac	tga	
I	K	E	W	V	E	E	Y	Y	A	H	H	H	H	H	H	H	-	

3.2.2. Pep geninin vektörlere klonlanması ve sentezi

Pep geni ile birlikte pET22b(+) vektörünün dairesel haritası, pET22b'nin klonlama bölgesinin restriksiyon enzimleri ile birlikte verilen detaylı DNA dizisi, klonlamanın yapıldığı enzimler de daire içine alınarak Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Pep geni ile birlikte pET22b(+) vektörünün dairesel haritası, pET22b'nin klonlama bölgesinin restriksiyon enzimleri ile birlikte verilen detaylı DNA dizisi (Novagen, 2019).

3.2.3. Pep genini içeren plazmitin çoğaltılması

Firma tarafından yapay olarak sentezlenen PEP genini taşıyan plazmitin (pET22b) çoğaltılması için, pET22b plazmiti kompetent hale getirilen *E. coli* DH5 α hücrelerine ısı şokuyla transfer edilmiştir. Transforme edilen *E. coli* DH5 α hücreleri 1:2 oranında 100 mg/mL ampisilin antibiyotiği içeren katı besiyerinde, bir gece boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında elde edilen koloniler, 4 mL’lik 1:2 oranında 100 mg/mL ampisilin antibiyotiği içeren sıvı besiyerinde, gece boyu 37°C’de yetiştirilmiştir. “Presto Mini Plazmit DNA izolasyon kiti” kullanılarak, protokole uygun bir şekilde pET22b DNA kültürü saflaştırılmıştır.

PİPES’li kompetent hücre hazırlanması

- - 80°C’de stoklanan DH5 α hücreleri LB besiyerinli petrilere inoküle edilerek 16 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon işleminden sonra, petriden 1 koloni alınarak içerisinde 25 mL SOB besiyeri bulunan 250 mL’lik erlene inoküle edildi ve 250 rpm’de 37°C’de 6 saat inkübasyona bırakıldı. İçinde 250 mL SOB bulunan 3 tane erlen kültür için hazırlandı ve bunlara 25 mL’lik DH5 α kültüründen sırasıyla 10 mL, 4 mL ve 2 mL inoküle edildi. Erlenler 18-22 °C arası 150 rpm’de 14 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.
- 45 dakikada bir kültürlerin 600 nm’deki OD değerleri ölçüldü, söz konusu değer 0.55’e ulaştığında kültür çalkalayıcıdan alındı ve 10 dakika buz banyosunda bekletildi.
- Hücreler 2500 g (3900 rpm) +4°C’de 10 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Gerekli hassasiyet gösterilerek santrifüj şişesindeki besiyerinin tamamı çıkartıldı.
- Hücrelere 0°C deki 80 mL PİPES’li tampon katıldı ve hassas şekilde yeniden süspansiyon haline getirildi ve bu hücreler 2500 g (3900 rpm), +4°C ‘de 10 dakika santrifüje bırakıldı. Bu işlemten sonra tüpün içindeki tampon solüsyon tamamen uzaklaştırıldı.

- 0°C’de ki hücrelere 20 mL PİPES’li tampon ilave edildi ve hassas bir şekilde tekrar süspansiyon haline getirildi, 1.5 mL DMSO eklenerek hafif bir şekilde karıştırıldı ve 10 dakika süreyle buz banyosunda inkübe edildi.
- Söz konusu inkübe işleminden sonra hücreler hızla steril mikrotüplere bölündü, sıvı azot içerisine atılarak hızlıca donması sağlandı ve bu hücreler -80°C’de muhafaza altına alındı (Inoue ve ark., 1990).

Transformasyon

- PİPES’li kompetent hücre hazırlanması işleminde -80°C’de muhafaza edilen kompetent hücreler buz banyosu içinde 200 µL alınarak soğutuldu, steril ependorf tüplere konuldu, üzerine 0,5 µL plazmid DNA (PEP) ilave edilen bu karışım 1 saat boyunca buz banyosuna alındı ve daha sonra 42°C’de 2 dakika ısı şokuna uğratıldı.
- Bu şoktan sonra karışım tekrar buza gömülerek 5 dakika bekletildi ve bu sürecin sonunda hücrelerin üzerine 200 µL LB besiyeri eklendi. Bu işlemten sonra hücreler 37°C 240 rpm’de 20 dakika inkübe edildi.
- Yukarıda yer alan işlemlerin sonunda her bir tüp birer antibiyotikli petriye yayma kültür yöntemi ile yayılarak 37°C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı (Hanahan, 1985).

Plazmit DNA saflaştırılması

Kolonilerin petrilere elde edilmesi sağlandıktan sonra, pET22b vektör sistemi için, karışımında ampicilin ve kloromfenikol bulunan 4 mL’lik steril sıvı LB içerisine tek koloni şeklinde inoküle edildi ve gece boyu 37°C’de inkübe edilerek yetiştirildi. Santrifüj yöntemiyle mikrotüplerde toplanan hücrelerden “Geneaid Presto Mini Plasmid” kiti kullanarak aşağıda detayları yer alan protokole göre plazmit DNA saflaştırıldı.

Hücrelerin Toplanması:

Bakteriyel hücre kültürü 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve oda sıcaklığında 1 dk süreyle 15 000 rpm’de santrifüj yapıldı. Süpernatantın tamamı dököldü.

Resüspansiyon:

Pelet vorteksle iyice karıştırılmadan önce 200 µL PD1 Tamponu eklendi ve bu karışım 2 dk oda sıcaklığında bekletildi.

Hücre Parçalanması:

Resüspansiyon aşamasında oda sıcaklığında 2 dk bekletilen Pelet_Tampon Karışımına 200 µL PD2 Tampon eklendi ve bu karışım yavaş yavaş 10 defa alt üst edildikten sonra oda sıcaklığında tekrar 2 dk bekletildi.

Nötralizasyon:

300 µL PD3 eklenen karışım hassas ve hızlı bir şekilde 10 defa karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 dk bekletildi.

DNA Bağlanması:

Karışım önce 15 000 rpm’de 6 dk santrifüjlendi ve daha sonra süpernatant PDH Kolon konulup 30 saniye 15 000 rpm’de santrifüjlendi.

Yıkama:

- Bu çerçevede önce altta bulunan sıvı döküldü, kolona 600 µL “Wash Solution” eklendi ve daha sonra 2 dk süreyle 15 000 rpm’de santrifüj yapıldı. Altta yer alan sıvı atıldı ve kolon aynı tüpe tekrar konuldu. Ek işlem olarak olarak 3 dk süreyle Wash Solution’ın kalan miktarını ayırmak amacıyla santrifüj yapıldı.
- Yukarıda yer alan ek işlem sonrasında kolon 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne konuldu, 50 µL steril saf su kolonun tam merkezine ekledi ve 60°C’de 2 dk bekletildi.
- 15 000 rpm’de 2 dk santrifüje alınarak plazmit DNA’lar saflaştırıldı

3.3. PEP Enziminin Üretilmesi (İndükleme)

E. coli BL21 (DE3) pLysE suşu, protein ekspresyon çalışmalarında kullanıldı. Stok hücreler -80°C’lik ortamdan çıkarıldıktan sonra, 4 µL kloramfenikol ve 8 µL ampisilinden oluşan 4 mL’lik LB besiyerine inoküle edildi ve akabinde 37°C’de 240 rpm’de 1 gece yetiştirildi. Yetiştirilen bu hücreler FSB’li kompetent hücre hazırlama protokolüyle uyumlu olarak kompetent haline getirildi.

3.3.1. FSB'li kompetent hücre hazırlanması

- 50 mL steril LB (Luria Bertani) besiyeri bulunan iki tane erlene gece inkübasyona bırakılan kültürden birer mL alınarak eklendi ve 37°C, 250 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- Gece inkübasyona bırakılan kültürden birer mL alındı ve içinde 50 mL steril Luria Bertani (LB) besiyeri olan 2 tane erlene eklendi. Erlenler 37°C'de 250 rpm'de inkübasyona bırakıldı.

Erlenlerin inkübatörden alınması aşamasında optik yoğunluk şartlarına özen gösterildi. 600 nm'de absorbansın yaklaşık 0.7 değerine ulaştığı anda bu işlem yapıldı. İnkübatörden alınan erlenler daha sonra +4°C 5000 rpm'de 10 dakika santrifüje bırakıldı. Süpernatant kısmı çıkartıldı ve pelet kısmına 50 mL soğuk Dondurulmuş Saklama Tamponu (FSB) solüsyonu eklendi. Vorteks işlemi çok iyi bir şekilde yapıldı ve akabinde erlenler buz banyosunda 1 saat bekletildi. Bu süreç tamamlandıktan sonra 10 dakika +4°C'de 4000 rpm'de santrifüje alındı. Süpernatant kısmı çıkartıldıktan sonra 8 mL soğuk FSB çözeltisi pelet üzerine eklendi ve tüpe vurarak çözünmesi sağlandı. Peletin tamamının çözülmesinden sonra üzerine 560 µL DMSO eklenen tüp 3 saat buza gömüldü. Bu işlemlerin tamamlanmasıyla kompetent hücre hazır hale gelmiş oldu (Hanahan, 1983).

Yukarıdaki kısımda ifade edilen transformasyon protokolü çerçevesinde kompetent hücrelere pozitif plazmitler aktarıldı. Bu işlemten sonra yayma yöntemiyle içinde kloramfenikol ve ampisilin antibiyotiği bulunan LB Agar besiyerine ekildi ve 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Çoğalan hücrelerden birer koloni alınarak besiyere inoküle edilmesinden sonra 37°C'de 240 rpm de gece boyu inkübe edildi. Bu işlemin tamamlanmasından sonra 600 mL antibiyotikli LB bulunan 2 L'lik steril erlenlere hücreler inoküle edildi.

Saat başı optik yoğunluğun kontrolü titizlikle yapıldı ve 600 nm'deki absorbansları okunarak yetiştirilme işlemi sürdürüldü. Vektör sistemine uyumlu bir şekilde optik yoğunluk değeri (OD) 0.7 olduğunda IPTG ilave edildi ve indüklendi. 3 saat inkübasyon işleminden sonra erlenler alındı ve 8 dakika sürecinde 6000 rpm'de

santrifüje bırakıldı. Yapılan bu işlemler sonucunda toplanan *E. coli* BL21 (DE3) pLysE hücreleri saklanmak üzere -20 °C'lik ortama kaldırıldı (Guda ve ark., 1995).

3.3.2. *E. coli* BL21 (DE3) pLysE hücrelerinin parçalanması

FSB'li kompetent hücre hazırlanması işlemi sonucunda toplanan (Kısım 3.3.1) ve saklanmak üzere -20 °C 'lik ortama kaldırılan *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücreleri, buz içine gömülü halde alınarak, üzerine yükleme tamponundan (pH:8) eklendi ve süspansiyon haline getirildi. 100 mM benzamidin ilavesi yapıldıktan sonra süspansiyon buz üzerine tekrar yerleştirildi. Buz üzerinde bulunan hücreler 1 saat müddetle sonikatör vasıtasıyla parçalandı. Süpernatant kısmı 6000 rpm'de 10 dakika sürede santrifüj ile alındı. Alınan bu süpernatant 30 000 rpm ve +4°C'de 60 dk santrifüjlendi ve karışımındaki hidrofobik olan hücre materyalleri ve diğer hidrofobik proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Yapılan bu işlemlere rağmen, elde edilmek istenen proteinin pelette olduğu ve inklüzyon cisimcikleri oluşturduğu gözlemlendi.

3.3.3. Pep enzimi için inklüzyon cisimciği oluşumunun azaltılması ve Pep enzimi için refolding (yeniden katlanma)

E. coli BL21(DE3) pLysE hücrelerinin parçalanmasında oluşan inklüzyon cisimciklerinin çözündürülerek PEP enzimi için yeniden katlanmasına ait verilen kararın uygulanmasında önce aşağıda detaylarıyla ifade edilen **I. protokol** işleme alındı:

E. coli hücrelerinde ve LB besiyerinde büyütülen hücrelerin OD'si 0.7 olduğunda 0.1 mM IPTG ile indüklendi. İndüklemekten 6 saat sonra toplanan hücreler -20 °C ortamına kaldırıldı. Bu ortamdan alınan hücreler Tris-HCl buffer (50 mM Tris, 0.1 mM DTT, pH:8.0) ile süspanse hale getirildikten sonra bu hücrelere lizozim enzimi eklendi ve sonikatörle 90 dk. parçalandı. Parçalama işlemi tamamlandıktan sonra 12 000 rpm de 15 dk santrifüje bırakıldı ve bu süreçte elde edilen pelet iki kez (50 mM Tris-HCl (pH:8.0), %2.5 triton X-100, %20 süktroz) içerikli resüspansiyon tamponla süspanse edildi, yıkandı (5mL/g) ve akabinde 12 000 rpm de 15 dk santrifüje bırakıldı. Santrifüj sürecinin tamamlanmasından sonra pelet 8 M üre içeren 50 mM Tris-HCl tampon

(pH:8.0) ile (5mL/g) 5 saat boyunca hassasiyetle karıştırılıp çözüldü ve tekrar 12 000 rpm'de 15 dk santrifüje bırakıldı.

Elde edilen süpernatant üzerine nihai protein yoğunluğu 0.2 mg/mL'den az olmak üzere damla damla soğuk yeniden katlanma tamponu (100 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, %20 gliserol (pH:8.0)) eklendi ve 4°C'de 16 saat hassas bir şekilde karıştırıldı. Karıştırma işleminin tamamlanmasından sonra 12 000 rpm de 15 dk santrifüj yapıldı, süpernatant alınarak 100 mM NaCl içeren 20 mM Tris HCl (pH:8.0) ortamında diyaliz edildi. Elde edilen ürün yükleme tamponuyla (100 mM Tris/HCl (pH:7.5)) yıkanmış Ni-NTA agaroz içeren kolana uygulandı ve kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplandı. 10 mM imidazol içeren 100 mM Tris/HCl (pH:8) tamponuyla protein yüklenmiş kolon yıkanarak kolon yapısına tutunmuş bütün proteinlerin bu yapıdan ayrılması sağlandı ve akabinde 300 mM imidazol içeren, 100 mM Tris/HCl (pH:8) tamponuyla kolona tutunmuş olan protein elüe edildi (Melissis ve ark., 2010). Her fraksiyondan alınan örnekler jel yükleme tamponuyla karıştırıldı, 100 °C'de 2 dakika denatüre edildi ve önceden hazırlanmış olan SDS PAGE jelinin kuyucuklarına yüklendi. Fazla boyası çıkarılmış olan boyalı jel daha sonra bir tarayıcı ile tarandı ve dijital ortama alındı.

E. coli BL21(DE3) pLysE hücrelerinin parçalanmasında oluşan inklüzyon cisimciklerinin çözündürülerek PEP enzimi için yeniden katlanmasına ait verilen kararın uygulanmasında daha sonra aşağıda detaylarıyla ifade edilen **II. protokol** işleme alındı:

Liziz:

Miktarı 5 mL/g olmak üzere pelet üzerine 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl (pH:8) eklendikten sonra hücreler süspanse edildi. Süspanse edilmiş olan bu hücrelerin üzerine 10 mg lizozim 100 µL bezamidin eklenerek 45 dakika sürecinde sonikasyona ve akabinde 4°C'de 12 000 rpm de 20 dakika santrifüje bırakıldı.

Yıkama:

Miktarı 5 mL/g olmak üzere 0.5 M NaCl, %2'lik Triton-X, 2 M üre 20 mM Tris-HCl pH:8 çözeltisi eklendi ve %62 power 4 cycle 5 dakika sonikatörde tutuldu. Bu işlemlerin tamamlanmasından sonra 2 kez +4 °C 'de 12 000 rpm' de 20 dakika

santrifüje bırakıldı. 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl pH:8.0 tamponu, Triton X-100 ve üreyi uzaklaştırmak için tekrarlandı.

Ekstraksiyon:

6 M guanidin hidroklorür, 20 mm Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol, 1 mM 2-merkaptöetanol pH:8 tamponu, 5 mL/g olacak şekilde ilave edilip, oda sıcaklığında 30-60 dakika karıştırıldı ve 12 000 rpm de 20 dakika santrifüje bırakıldı.

Saflaştırma:

Önce 5 mL su ile 1 mL Ni-NTA rezin ile kolon dikkatlice yıkandıktan sonra kolona 10 mL ekstraksiyon tamponu konuldu. Santrifüjden alınan örnek kolona verildi ve kolon 10 mL yıkama tamponuyla tekrar yıkandıktan sonra bu sefer 20 mM imidazolle bir kez daha yıkandı ve akabinde refolding yapıldı.

Refolding:

Yıkama tamponundan başlayarak 6-0 M üre gradienti oluşturuldu. 1 mM 2-merkaptöetanol, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 20 mM TrisHCl, temelinde sırasıyla 6M, 5M, 4M, 3M, 2M, 1M ve 0M üre içeren tampondan 5'er mL olacak şekilde, 0,1-1 mL/dk hızla kolondan geçirildi.

Elüsyon:

Kolondan 10 mL 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol, 1 mM 2-merkaptöetanol pH:8.0 ve 10 mL 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM 2-merkaptöetanol pH:8.0 tamponunun geçirilmesinden sonra protein nihai olarak 20 mL 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 300 mM imidazol, 1 mM 2-merkaptöetanol pH:8.0 tamponu ile elüe edildi.

3.3.4. Pep enziminin aktivesinin belirlenmesi

Ticari substrat için Endoproteaz (EPR) aktivitesi, Edens ve diğerleri tarafından bildirilen metodoloji kullanılarak belirlendi. Sentetik substrat (Z-Gly-Pro-pNA, benzyloxycarbonyl-glycine-proline-p-nitroanilide) önce 250 µM çözelti hazırlamak için 60 °C'de 1.4 dioksan (%40 su) içinde çözüldü. Endoproteaz (EPR) aktivitesi, bir sitrat/disodyum fosfat tamponunda (McIlvaine) (pH=5.0), 37°C'de sentetik substrat olarak Z-Gly-Pro-pNA kullanılarak belirlendi. Reaksiyon ürünleri, 410 nm'de

spektrofotometrik olarak izlendi. Endoproteaz (EPR) aktivitesinin bir ünitesi, yukardaki koşullar altında dakikada 1 μ mol p-nitroanilidi hidroliz etmek için kullanılan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Edens ve ark., 2005).

3.3.5. Pep aktivitesi üzerine bazı parametrelerin etkisi

pH'nın etkisi

Enzimin optimum aktivite göstermiş olduğu pH değerinin tespit edilmesi amacıyla, pH 2.2-8 arasında McIlvaine tamponu ve pH 9-10 da Tris-HCl tamponu kullanıldı, bu şekilde farklı pH değerlerine sahip (2.2-10), %1'lik substrat çözeltileri hazırlandı.

Tampon ve substrat karışımı 30°C'de 5 dakika inkübe edilerek aktivite tayini yapıldı. İnkübasyondan sonra enzim ilave edilerek 5 dk inkübe edildi ve soğutma işlemine geçildi. Bu işlemler bittikten sonra 410 nm dalga boyunda nanodropla absorbans ölçümü yapıldı. Kör olarak, eşit hacimde substrat ve tampon çözeltisi kullanıldı. Bağlı enzim aktivitesi % olarak en yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri esas alınarak tespit edildi.

Sıcaklığın etkisi

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisini tespit etmek için 25, 30, 37, 50, 60, 70°C'lik sıcaklıklarda ölçümler yapıldı. Bu aşamalarda substrat ve tampon karışımı tanımlanan optimum pH değerinde 5 dakika inkübe edildi ve bu işlemten sonra enzim ilave edilerek 5 dk daha kaynatıldı. Kaynatma işlemi bitince soğutma işlemine geçildi ve 410 nm dalga boyunda nanodropla absorbans ölçümü yapıldı.

Absorbans değerinin en yüksek görüldüğü sıcaklık değeri esas alınarak % bağlı enzim aktivitesi tespit edildi.

Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Enzimler 30, 40, 50, 60°C’lik sıcaklıklarda 30 dakikalık aralıklarla 0, 30, 60 ve 90 dk boyunca termal stabilitesinin tespit edilmesi için inkübe edildi. Sonra optimum şartlarda aktivite tayini ön inkübasyon yapılarak belirlendi.

Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisini tespit etmek amacıyla, optimum koşullarda ki enzim aktivitesi değişen substrat miktarına (5,10,15,25,30,40 µL) karşı tanımlandı.

Michaelis-Menten kinetik modeli ve Lineweaver-Burk modelleri kullanılarak ölçüm sonuçları yorumlanmıştır. Enzim-substrat spesifikliği için, kullanılan kinetik modeller K_m ve V_{max} değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. Sabit enzim konsantrasyonuna karşı substrat konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak ulaşılan maksimum hız noktası V_{max} ‘dir. Maksimum hızın yarısına ($V_{max}/2$) karşılık gelen substrat derişimi (Michaelis-Menten sabiti) K_m değeri olarak belirtilmektedir. V_0 reaksiyonun hızıdır.

$$\text{Michaelis-Menten modeli; } V_o = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

$$\text{Lineweaver-Burk modeli; } \frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{V_{max}}$$

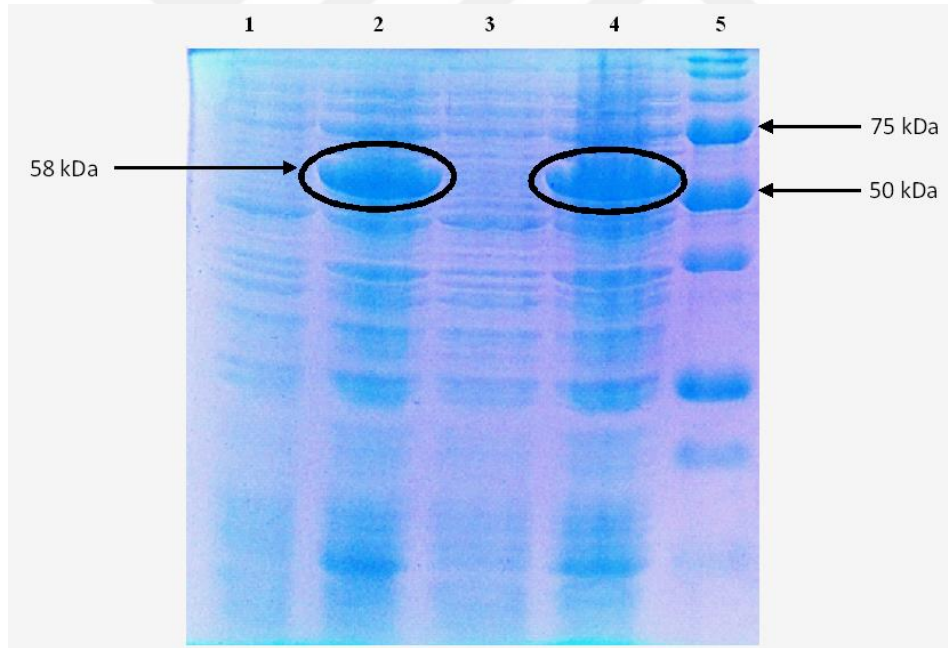
Enzim aktivitesi ayrıca Socha ve arkadaşlarının metoduna göre (2015), *A.niger* PEP’inin aktivite tayinin de %60’lık etanolde çözölen gluten, enzim: gliadin oranı 1: 25 olacak şekilde enzimin çalıştığı optimum koşullarda proteolize bırakıldı. 1 saat sonra sonlandırılıp, örnekler SDS-PAGE’e yüklendi (Şekil 4.9) (Socha ve ark., 2015).

4. BULGULAR

4.1. Pep Enziminin Üretilmesi (İndükleme)

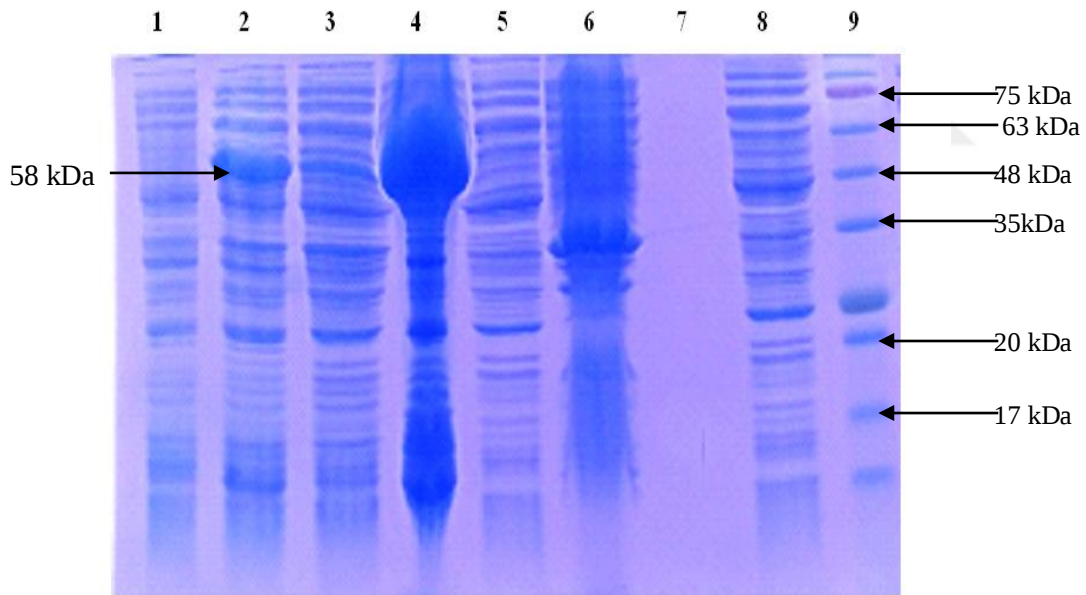
DNA dizileme için gönderilen plazmitler, *E. coli* BL21 (DE3) pLysE suşuna transfer edildi. Transformasyon yapıldıktan sonra, petrilere ekilen kolonilerden birer koloni alınarak, 4 mL'lik antibiyotikli LB tüplere inoküle edildi ve bir gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında bu kültürler, antibiyotikli 50 mL'lik LB besiyerlerine transfer edildi ve 240 rpm'de 37°C'de çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Optik yoğunluk 0.7 olduğunda IPTG ile indükleme yapıldı. Daha sonra 4 saat daha inkübe edilen hücrelerden, SDS PAGE'de analiz edilmek üzere numuneler alındı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. pET22b vektör sistemi için indükleme SDS-PAGE görüntüsü. **1 ve 3** numaralı kuyucuklarda pET22b plazmidini içeren, indüklenmeden önceki *E.coli* BL21 pLysE hücreleri, **2 ve 4** numaralı kuyucuklarda indüklendikten sonraki pET22b plazmidini içeren *E.coli* BL21 pLysE hücreleri ve 5 numaralı kuyucuk Protein marker (SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard)

İndüklemenin ardından, saklanan hücreler -20°C'den çıkarılarak buz üzerinde sonikatörle parçalandı. Karışımdaki hidrofobik proteinlerle hidrofobik hücre materyallerini çöktürmek amacıyla, sonrasında +4°C'de 30 000 rpm'de 1 saat santrifüj edildi. Süpernatant ve peletten farklı miktarlarda örnekler alındı. Peletten alınan örnekler hem SDS örnek yükleme tamponuyla, hem de resüspanسیون buffer ile çözülerek jele yüklendi. Protein olup olmadığının doğru bir şekilde analiz edilmesi için bu aşamada peletin etkin bir şekilde çözülmesi sağlandı. Süpernatant kısmı afinite kolon kromatografisiyle saflaştırılma işlemine tabi tutuldu. Afinite kolon kromatografisinde, kolondan elüsyon için imidazol içeren elüsyon tamponu ve kolon dolgu maddesi olarak Ni-NTA agaroz rezin kullanıldı. Fraksiyonlar, SDS-PAGE ile analiz edildi. SDS-PAGE görüntüsü sonucu, PEP proteininin pelette olduğu gözlemlendi. Sonuçta, elde etmeye çalıştığımız proteinimizin inklüzyon cisimcikleri şeklinde çöktüğü anlaşıldı (Şekil 4.2).



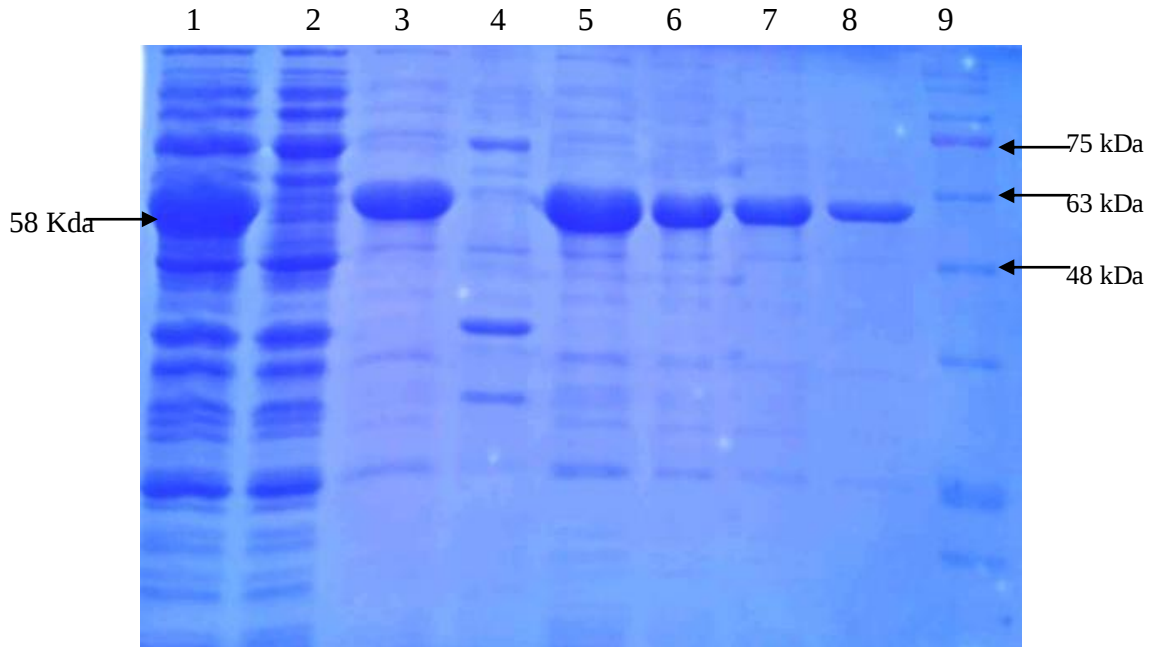
Şekil 4.2. pET22b vektör sistemi için saflaştırma SDS-PAGE görüntüsü. 1. İndüklenmemiş pET22b plazmiti içeren *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücreleri, 2. İndükleme sonrası pET22b plazmiti içeren *E. coli* BL21 (DE3) pLysE hücreleri, 3. Sonikatör ile parçalanmış pET22b plazmiti içeren *E. coli* BL21 (DE3) pLysE hücreleri, 4. Ultrasantrifüj sonrası pET22b plazmitini içeren *E. coli* BL21 (DE3) pLysE hücreleri, 5. Yüksek hızda santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, 6. Yüksek hızdaki santrifüj sonrası elde edilen peletten farklı miktarlarda alınan örnek (SDS örnek yükleme tamponu ile çözülmüştür), 7. His-Link afinite rezini içeren kolonun pH:7.5 tamponu ile yıkanması sonucu alınan solüsyondan alınan örnek, 8. 300 mM imidazol içeren tamponla kolonun yıkanması sonucu alınan ve Pep enzimini içeren elüsyon 9. Protein Marker (NZY Colour Protein Marker II).

4.2. Pep Enziminde İnküzyon Cisimciği Oluşumunun Azaltılması

Bu amaçla, *E. coli* hücreleri kompetent hale getirilerek, hücrenin inküzyon cisimciği oluşturması engellendi. Plazmit, *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücrelerine ısı şokuyla transfer edildi. Daha sonra LB besiyeri ve 0.1 mM IPTG konsantrasyonunda *E. coli* hücreleri yetiştirildi. Sonuçta protein üretimi gerçekleşti, ancak proteinin çözünür formu elde edilememiştir.

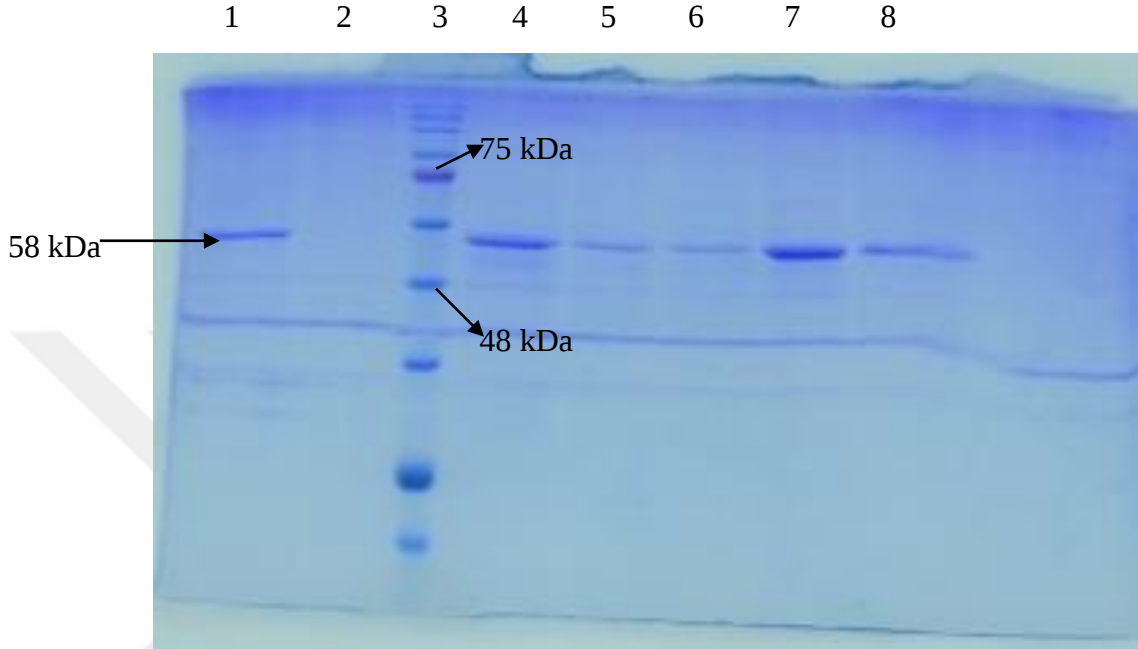
4.3. I. Protokol, Pep Enzimi için Yeniden Katlanma (Refolding) ve Pep Enziminin Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması

LB besiyeri ve *E. coli* hücrelerinde büyütülen hücreler OD: 0.7 olduğunda 0.1 mM IPTG ile indüklendi. İndüklemekten 6 saat sonra toplandı. Sonrasında, toplanan hücreler sonikatörle parçalanma işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işleminden sonra, toplanan pelette yeniden katlanma (refolding) prosedürü uygulandı (Bkz.: başlık 3.3.3). Kromatografide saflaştırılıp, elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE'de analiz edildi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Yeniden katlanma (refolding) prosesinin SDS-PAGE ile analizi. **1.** Sonikatör ile parçalanmış *E. coli* hücreleri **2.** 12 000 rpm'de santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, **3.** 12 000 rpm'de santrifüj sonrası elde edilen pelet (resüspanسیون tamponu ile çözülmüştür), **4.** Resüspanسیون tamponu ile iki kez yıkanmış süpernatant

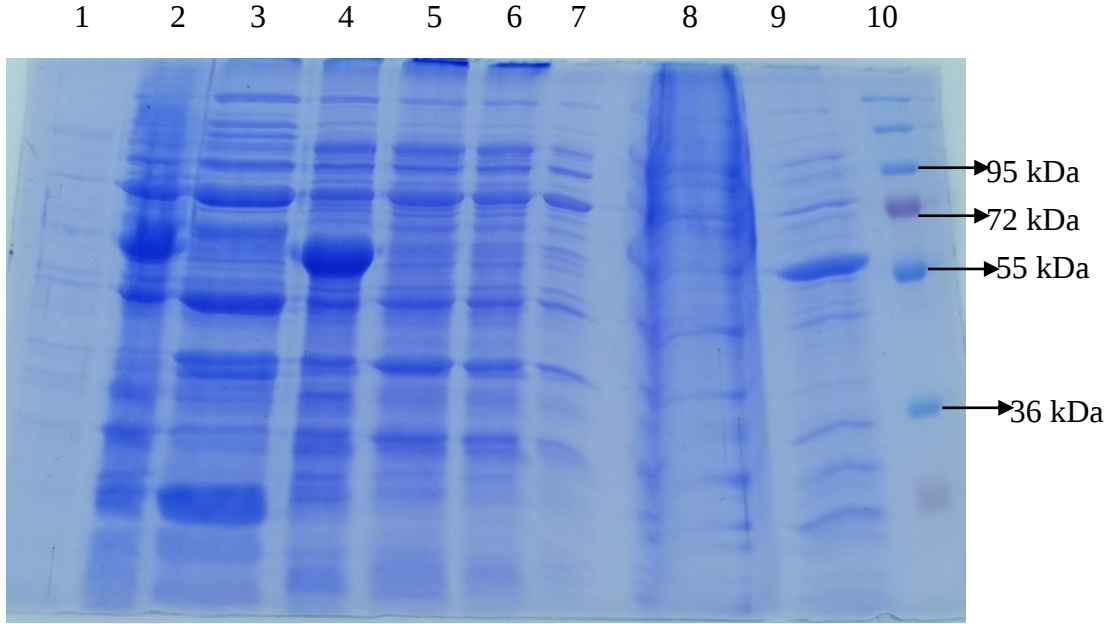
5. Resüspansiyon tamponu ile iki kez yıkanmış pelet, 6. 5 saat sonra süpernatant 7. Yeniden katlanma (refolding) solüsyonu içerisinde çözölmüş süpernatant 8. Yeniden katlanma (refolding) solüsyonu içerisinde çözölmüş pelet 9. Protein marker (NZYColour Protein Marker II)



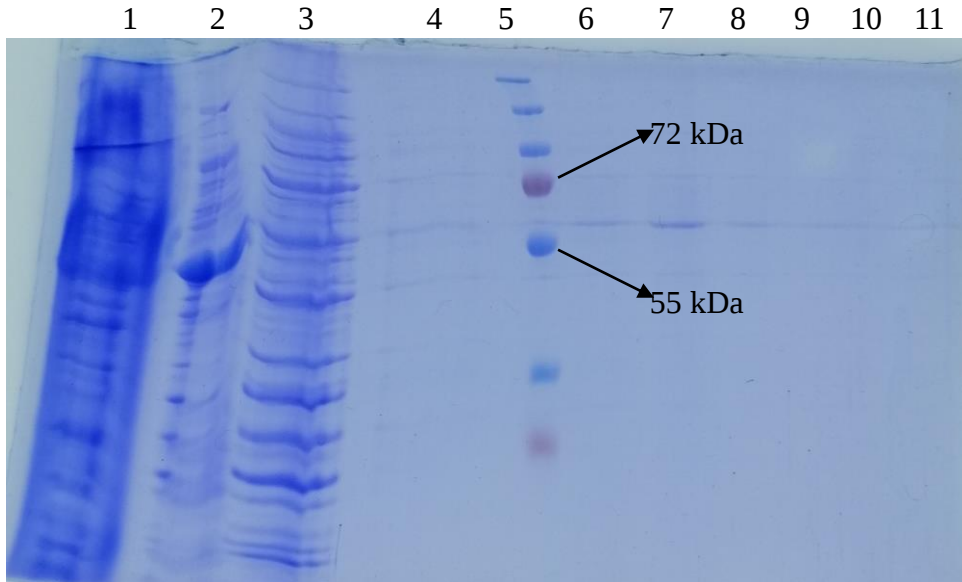
Şekil 4.4. Kolondan saflaştırma prosesinin SDS-PAGE görüntüsü 1. Diyaliz sonrası kolana yüklenen örnekten aşağı akan süzöntü, 2. Kolonun pH:7,5 tamponu ile yıkanması sonucu solüsyondan alınan örnek, 3. Protein marker (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder) 4,5,6 Kolondan 300 mM imidazol içeren elüsyon tamponunun geçirilmesiyle elde edilen süzöntü (Elüsyon 1,2,3) 7. Diyaliz öncesi kolona yüklenen örnek 8. Diyaliz sonrası kolona yüklenen örnek

4.4. II. Protokolle, Pep Enzimi için Yeniden Katlanma (Refolding) ve Pep Enziminin Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması

LB besiyeri ve *E. coli* hücrelerinde büyütölen hücreler OD: 0,7 olduğuunda 0.1 mM IPTG ile indöklendi ve indöklemekten 6 saat sonra toplandı. Sonrasında, hücreler sonikatörle parçalanma ilemine tabi tutuldu. II. protokoldeki gibi santriföj işleminden sonra toplanan pelette yeniden katlanma (refolding) prosedürü uygulandı (Bkz.: 3.3.3) Afinite kromatografisiyle saflaştırılıp, fraksiyonlar SDS-PAGE’de analiz edildi. (Şekil 4. 5 ve Şekil 4. 6).



Şekil 4.5. Yeniden katlanma (Refolding) prosesinin SDS-PAGE ile analizi. **1.** İndüklenme öncesi pet22b plazmitini içeren *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücreleri, **2.** İndüklenme sonrası pet22b plazmitini içeren *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücreleri, **3.** 12000 rpm’de santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, **4.** 12000 rpm’de santrifüj sonrası elde edilen pelet, **5.** Yıkama tamponu ile iki kez yıkanmış süpernatant, **6.** Yıkama tamponu ile 2.kez yıkanmış pelet, **7.** 1.basamak sonrası süpernatant, **8.** 3.basamak olan ekstraksiyon sonrası süpernatant, **9.** 3.basamak olan ekstraksiyon sonrası çözülmüş pelet, **10.** Protein marker (20% Tris-glycine SDS-PAGE).



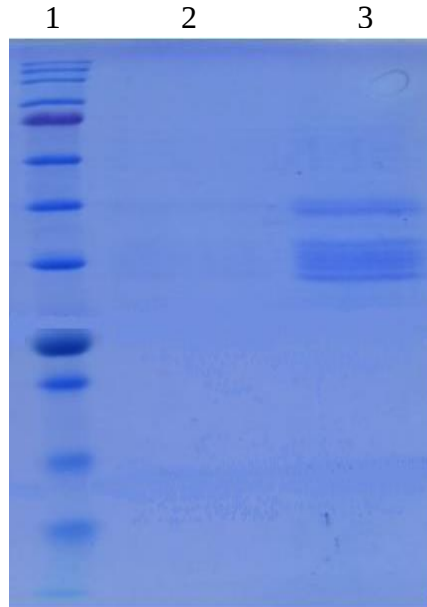
Şekil 4.6. Kolondan saflaştırma prosesinin SDS-PAGE görüntüsü. **1.** Kolon sonrası elde edilen supernatant, **2.** Son işlemdeki pelet, **3.** Kolona yüklenen örnekten aşağı akan süzöntü, **4.** Kolonun pH:7.5 tamponu ile yıkanması sonucu solüsyondan alınan örnek **5.** Protein marker (20% Tris-glycine SDS-PAGE), **6, 7, 8, 9, 10 ve 11.** Kolondan elüsyon

tamponunun (300 mM imidazollü) geçirilmesiyle elde edilen süzüntüler (Elüsyon 1, 2, 5, 7, 9, 10).

4.5. Pep Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Schägger ve von Jagow metoduna göre (1987), *A. niger* PEP'in aktivite tayinin de %60'lık etanolde çözülen gluten, pH=3 e ayarlanan 0.1 M sitrat bufferı ile, enzim: gliadin oranı 1:25 olacak şekilde 55°C'de proteolize bırakıldı. 1 saat sonra durdurulup, örnekler SDS-PAGE 'e yüklendi (Şekil 4.7).

Ticari substrat için Endoproteaz EPR aktivitesi, Edens ve diğerleri tarafından bildirilen metodoloji kullanılarak belirlendi. İlk olarak sentetik substratımız Z-Gly-Pro-pNA (benzyloxycarbonyl-glycine-proline-p-nitroanilide) , 250 µM çözelti hazırlamak için 60 °C'de 1,4 dioksan (%40 su) içinde çözüldü. Endoproteaz EPR aktivitesi, bir sitrat/ disodyum fosfat tamponunda (pH 5.0), 37°C'de sentetik substrat olarak Z-Gly-Pro-pNA kullanılarak belirlendi. Reaksiyon ürünleri, 410 nm'de spektrofotometrik olarak izlendi. Endoproteaz EPR aktivitesinin bir ünitesi, yukardaki koşullar altında dakikada 1 µmol p-nitroanilidi hidroliz etmek için kullanılan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

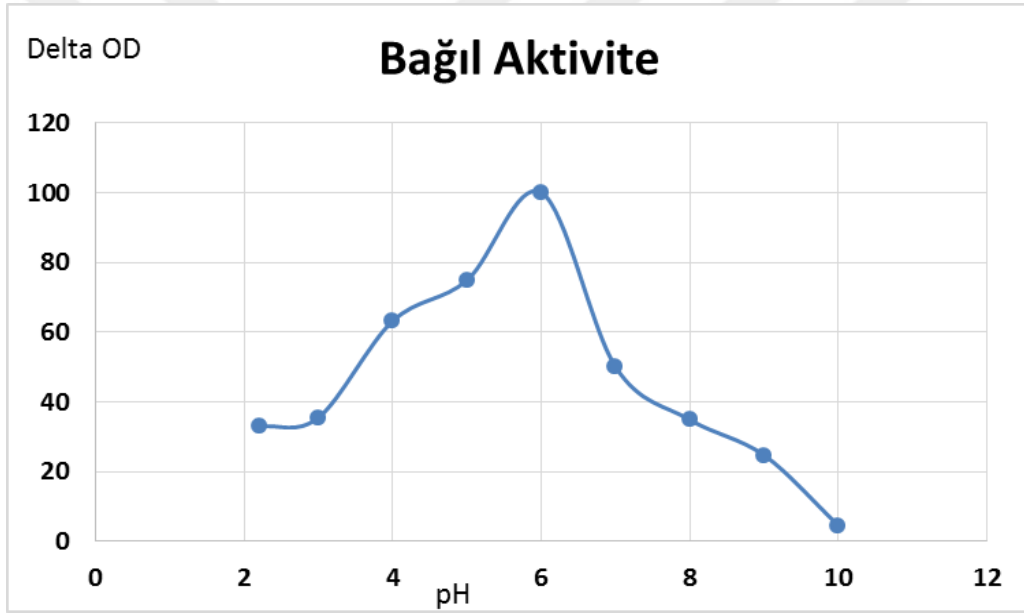


Şekil 4.7. Pep enzim aktivitesinin SDS-PAGE ile analizi. 1. DNA marker (Hyper Ladder 1 kb), 2. Enzim ilave edilince aktivite, 3. Enzim içermeyen gluten örneği.

4.5.1. Pep aktivitesi üzerine bazı parametrelerin etkisi

4.5.2. pH'nın etkisi

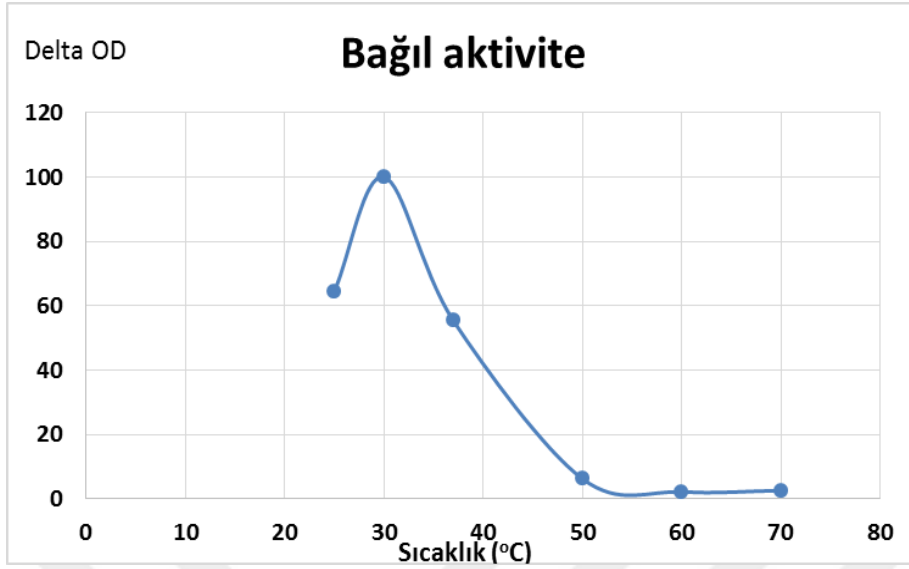
PEP enziminin, optimum aktivite göstermiş olduğu pH değerinin tespit edilmesi amacıyla, farklı pH değerlerindeki (2,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) tamponlar kullanılarak, Z-Gly-Pro-pNA substratı varlığında, enzim aktivitesi tayinleri yapıldı. pH-% bağıl aktivite eğrisi, elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizildi (Şekil 4.8). Çizilen eğri grafiğine göre, optimum pH'nın 6 olduğu görülmektedir. Analizler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 4.8. Pep enzimin pH bağımlılık eğrisi

4.5.3. Sıcaklığın etkisi

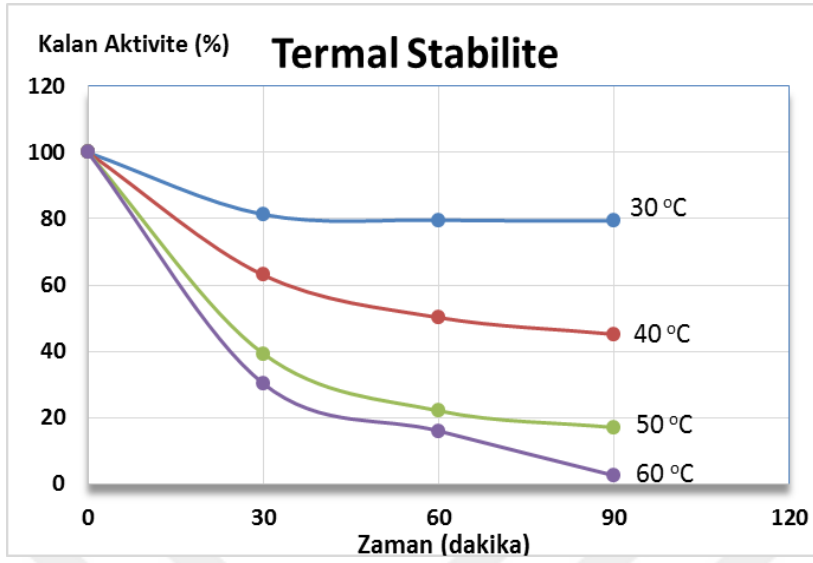
Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisini tespit etmek için; 25, 30, 37, 50, 60, 70°C'lik sıcaklıklarda ve pH 6 da ölçümler yapıldı. Sıcaklık-% bağıl aktivite eğrisini çizmek için, elde edilen aktivite değerleri kullanıldı (Şekil 4.9). Çizilen eğriye göre, optimum sıcaklık 30°C olarak belirlenmiştir. Analizler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 4.9. Pep enzimin sıcaklık bağımlılık eğrisi

4.5.4. Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

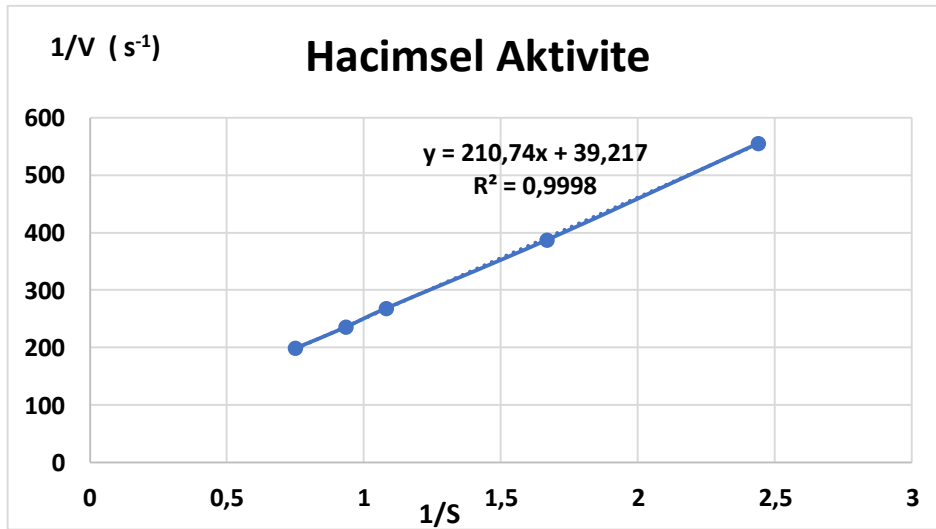
Termal stabiliteyi belirlemek için enzimler, 30, 40, 50 ve 60°C'lik sıcaklıklarda; 0, 30, 60 ve 90 dk boyunca inkübe edildi. Ön inkübasyon uygulamasından sonra optimum şartlarda aktivite tayini yapıldı. Zaman-kalan aktivite (%) eğrisini çizmek için elde edilen aktivite değerleri kullanıldı (Şekil 4.10). Enzimin 60°C'de 90 dk sonunda aktivitesini neredeyse tamamen kaybettiği belirlendi. 60°C'de 60 dk sonunda aktivitesini yaklaşık %84, 50°C'de ise 90 dk sonunda ise aktivitesini yaklaşık %83 oranında kaybettiği belirlendi.



Şekil 4.10. Pep enzimin ısıl kararlılık eğrisi

4.5.5. Substrat konsatrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesine substrat konsatrasyonunun etkisini tespit etmek amacıyla, optimum koşullardaki enzim aktivitesi değişen substrat miktarına (5,10,15,25,30,40 μL) karşı tanımlandı. Linewear-Burk eğrisi çizmek için, elde edilen veriler kullanıldı. K_m değeri 5.37 mM, $V_{\max}$ 0.025 mM / s olarak belirlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Pep enzimi için Linewear-Burk eğrisi

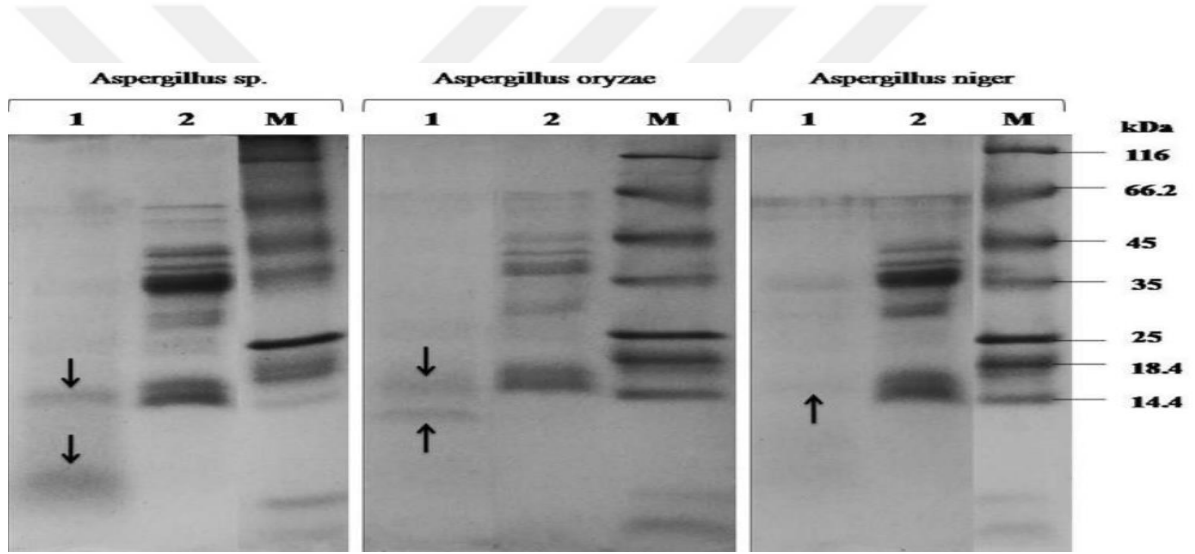
TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, çölyak hastaları için sorun oluşturan glutenin, biyoteknolojik yöntemlerden olan rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen PEP enzimiyle giderilmesi araştırılmıştır. PEP enzimi, bakteriyel ekspresyon sisteminde üretilmiştir. Bakteriyel ekspresyon sistemleri, hızlı, yüksek miktar ve düşük maliyette protein üretiminden dolayı oldukça yaygın olarak tercih edilmektedir. Fakat üretilecek protein büyük olduğu zaman, protein katlanmaları, inklüzyon cisimciği oluşturma yatkınlığı ve post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirememesi gibi durumlarda bu sistemin dezavantajlarıdır. PEP enzimi geni, *A. niger* organizmasının gen dizisinden olup biyoinformatik araçlar kullanılarak kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Nükleotid sekans aminoasit sekansı değiştirilmeden *E. coli* hücrelerine göre kodon optimizasyonu yapılmıştır. Bu sayede PEP enziminin *E. coli* hücrelerinde ekspresyon seviyesinin artırılması amaçlanmıştır.

E. coli BL21 (DE3) pLysE hücrelerine transformasyon işlemi yapılmıştır. Ekspresyon çalışmalarında indükleyici ajan olarak IPTG kullanılmıştır ve hücreler O.D 0.7 ye geldikten sonra indükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ortama IPTG ilave edilmeden önce erlenden 1 mL alınarak hücreler santrifüj edilmiş ve pelet resüspanse edilerek üzerine 100 µL sds örnek yükleme tamponu eklenmiştir. Bu işlem indükleme yapıldıktan 3 saat sonra alınan hücrelere aynı şekilde uygulanmıştır. Şekil 4.4 'de bu alınan iki örneğin karşılaştırılması verilmektedir. İndükleme öncesi ve sonrası hücreler, bizim rekombine vektörü içermeyen pLysE hücresi ile karşılaştırılarak hücrelerin PEP enziminin üretilip üretilmediği karşılaştırılmıştır. Bu sonuca göre indükleme sonrasında yaklaşık 58 kDa ağırlığında PEP enziminin varlığı görülmüştür. Ancak, saflaştırma sonrası proteinin pelette, inklüzyon cisimcikleri oluşturduğu görülmüştür. İki farklı inklüzyon prosedürü uygulanmıştır. İlk protokolle, 1 L bakteri kültüründen 280 mg gibi çok yüksek miktarda protein elde edildi. Ancak II. protokol sonrası elde edilen protein miktarı az olduğu için, ilk protokol sonrası elde edilen protein sonraki aşamalarda kullanılmıştır. PEP enzimini ürettiği belirlenen hücre alınarak büyük ölçekte üretim yapıp saflaştırılması gerçekleştirilerek ilk olarak elüsyonların spektrofotometrede absorbans 280 nm deki değerlerine bakılmıştır. Bu değerlerde elüsyon 1, elüsyon 2 ve

elüsyon 3 de protein varlığı gözlemlenmiştir ve SDS-PAGE analizi yapılmıştır. SDS-PAGE analizine göre elüsyon 1’den alınan örneklerle aktivite testi yapılmıştır.

Socha ve arkadaşları, *Aspergillus*’un (*Aspergillus spp.*, *A. oryzae*, *A. niger*) farklı türlerinden elde edilen fungal proteazların, bir substrat olarak buğday gliadinleri üzerindeki proteolitik aktivitesine bakmışlardır. En etkili proteolitik aktiviteyi, *A.niger*’den elde edilen asit proteazda gözlemişlerdir. Buğday gliadinleri ve düşük moleküler ağırlıklı peptitler tamamen parçalanmıştır (Şekil 1). Ancak, *A. spp.* ve *A. oryzae*’den elde edilen proteaz, gliadini tamamen parçalayamamış, 15 kDa’dan daha küçük peptitler saptamışlardır (Socha ve ark.,2015).



Şekil 12. *Aspergillus spp.*, *A. oryzae* ve *A. niger*’den izole edilen spesifik fungal proteazlar kullanılarak , 60 dakika sonrası SDS-page ile , buğday gliadinlerinin molekül ağırlıklarının tayini ve hidroliz derecesi.

Şekil 4.7.’de görüldüğü gibi, bizim ürettiğimiz PEP enzimi de gliadini tamamen parçalamış ve literatürdeki ile aynı sonuçlar gözlenmiştir.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, elde edildiği mikroorganizmalara göre PEP ’in optimum pH ve pH stabiliteleri: *A. oryzae* ve *A. niger*’den ekstrakte edilen PEP’in maksimum aktivitesi sırasıyla pH 4 ve 4.2, stabil pH’nın 3-5 olduğu görülmüştür. Öte yandan, diğer protil endopeptidazların alkali pH’ta maksimum aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Örneğin; *Halobacterium halobium* S9 (pH 8.7), *Sphingomonas capsulata* (pH 8.5), *Pseudomonas sp. KU-22* (pH 8), *Xanthomonas sp.* (pH 7.7) ve *Aeromonas*

hydrophila (pH 7.7) dir. *Flavobacterium meningosepticum* (pH 7) ve insan beyinde (pH 6.8)' de en yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Shetty ve ark., 2017).

Aynı araştırmacılar yaptıkları çalışmaya göre, elde edildiği mikroorganizmalara göre PEP'in optimum sıcaklığı: *A. niger* 42°C, *Pseudomonas sp. KU-22* 45°C, *Sphingomonas capsulata* 43°C, *Halobacterium halobium S9* 40°C, *Flavobacterium meningosepticum* 40°C, *A. hydrophila* 30°C ve insan beyinde 37°C olarak bulunmuştur (Shetty ve ark., 2017).

Arısoy ve arkadaşları, yine PEP ailesinden, mikrobiyal Dipeptidil Peptidaz IV'ün enzim-substrat spesifikliğini belirlerken pNA ile işaretlenmiş sentetik Gly-Pro-pNA ve Ala-Pro-pNA substratlarını kullanmışlar ve Gly-Pro-pNA peptit dizisine ait K_m değeri 0.57 mM ve V_{max} değeri 0.017 mM min⁻¹; Ala-Pro-pNA substratına ait K_m değeri 2.90 mM ve V_{max} değeri 0.018 mM min⁻¹ olarak belirlemişlerdir (Arısoy ve Üstün Aytekin., 2018).

Shetty ve arkadaşları; *Sphaerobacter thermophilus*'dan rekombinant olarak elde ettikleri PEP'in, moleküler ağırlığını 77 kDa, optimum pH'ını 6.6, optimum sıcaklığını 63°C, Lineweaver Burk grafiğine göre de, reaksiyon çözeltisinde 4.16 mg protein olduğunda, V_{max} ve K_m sırasıyla 3.47 mM / s ve 1.5 mM olarak bulmuşlardır.

Kang ve ark., *Pichia pastoris* de ekspresyonu yapılan AO-PEP'in (*A. oryzae*), farklı substratlarda kinetik parametrelerini 40°C ve pH 4'de belirlemişlerdir. AO-PEP'in, Ala-Pro-pNA'ya karşı katalizör aktivitesinin olmadığını, fakat Z-Gly-Pro-pNA, Ala-Ala-Pro-pNA ve Z-Ala-Ala-Ala-Pro-pNA'yı hidrolize etme kapasitesine sahip olduğunu görmüşlerdir. Z-Gly-Pro-pNA'nın; K_m , k_{cat} ve k_{cat} / K_m sırasıyla 0.37 mM, 105.7 s⁻¹ ve 285.7 s⁻¹ mM⁻¹ olduğunu belirlemişlerdir. Z-Ala-Ala-Ala-Pro-pNA'nın ve ($K_m = 0.56$ mM, $k_{cat} = 93$ s⁻¹, $k_{cat} / K_m = 166.1$ s⁻¹ mM⁻¹) ve Ala-Ala-Pro-pNA'nın ($K_m = 0.28$ mM, $k_{cat} = 139.4$ s⁻¹, $k_{cat} / K_m = 496.4$ s⁻¹ mM⁻¹) olarak belirlemişlerdir (Kang ve ark., 2015).

Kang ve ark., başka bir çalışmada da yine substrat çeşidinin reaksiyon hızı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sentetik substratlar olarak Z-Gly-Pro-pNA, Ala-Pro-pNA, Ala-

Ala-Pro-pNA ve Z-Ala-Ala-Ala-Pro-Pna kullanmışlardır. Sonuçlar, AO-PEP'in dipeptidli Ala-Pro-pNA'yı hidrolize etmediğini görmüşlerdir. Ala-Ala-Pro-pNA için daha yüksek afinite görülmüştür. ($K_m = 0.18 \text{ mM}$, $k_{cat} = 107.4 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat} / K_m = 596.67 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). Diğer iki substratın Z-Gly-Pro-pNA ($K_m = 0.26 \text{ mM}$, $k_{cat} = 240 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat} / K_m = 24 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) ve Z-Ala-Ala-Ala-Pro-pNA ($K_m = 0.37 \text{ mM}$, $k_{cat} = 75 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat} / K_m = 202.7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) olarak belirlenmiştir. Yapılan iki çalışmada da görüldüğü gibi, K_m değerleri literatürde çok düşüktür (Kang ve ark., 2014).

Bu çalışmada da, *E. coli* BL21 (DE3) pLysE hücresinde ekspresyon yaptığımız PEP enzimi pH 2.2-8 aralığında çalışmakta ve optimum pH'sı 6, 25-50°C sıcaklık aralığında çalışmakta olduğu ve optimum sıcaklığı da 30°C olarak bulunmuştur. Asidik pH da maksimum aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Enzimimizin çok geniş bir pH aralığında çalışmasının avantajı sayesinde, maya da ekspresyonu yapıldığında mide asiditesinden etkilenmeyip bağırsağa geçecek ve çölyak hastalığı için bir umut olacaktır. Enzim-substrat spesifikliğini belirlerken pNA ile işaretlenmiş florojenik sentetik Z-Gly-Pro-pNA substratı kullanılmıştır. Reaksiyon çözeltisinde 1 mg proteinimiz olup, Lineweaver Burk eşitliğine göre de, V_{max} ve K_m sırasıyla 0.025 mM/s ve 5.37 mM olarak bulunmuştur. Bir enzimin K_m değeri ne kadar düşük ise substrata afinitesi o kadar yüksektir. Enzimimizin K_m değerinin nispeten yüksekliği enzimin substrata afinitesinin düşük olduğunu göstermektedir. Bu durum refolding işlemlerinden kaynaklı proteinin substrata olan afinitesinde bir azalmanın söz konusu olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışma ile, ilk kez *E. coli*'de AN-PEP enziminin rekombinant üretimi ve saflaştırılması üzerine yeni bir metodoloji sunmuş olduk. Üretilen rekombinant PEP enziminin bu çalışma sonucunda aktivite gösterdiği ortaya koyulmuştur. Sonuç olarak, bu çalışmada ürettiğimiz rekombinant AN-PEP enzimi glutensiz gıda üretiminde kullanılabilir niteliktedir. Ancak, gıda endüstrisinde kullanmak için, maya veya ökaryotik ekspresyon sistemlerinde PEP enziminin üretilmesi ve kullanımı daha uygun olacaktır. Daha sonraki çalışmalarda ise ülkemizin ve mevcut pazarın ihtiyaçları göz önünde bulundurularak bu potansiyelin en iyi şekilde değerlendirilmesi hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- Akobeng, A.K., and Thomas A. G., 2008. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(11), 1044-1052.
- Anonim, 2011. [http:// www.MayoClinic.com](http://www.MayoClinic.com) Health Library.Celiac disease and the small intestine (10.05.2011).
- Anonim, 2019. <http://scienceniche.com/wp-content/uploads/2008/12/plasmidprocess.gif> (22.08.2019).
- Anonim, 2020. [https:// www.colyak.gen.tr/colyak-hastaligi-diyeti.html](https://www.colyak.gen.tr/colyak-hastaligi-diyeti.html) (23.01.2020).
- Aravindan, R., Anbumathi, P., and Viruthagiri, T., 2007. Lipase applications in food industry. *Indian J Biotechnol*, 6, 141-58.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayinevi, Ankara.
- Arısoy, S., and Üstün Aytekin, Ö., 2018. Mikrobiyal Dipeptidil Peptidaz IV'ün Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, Tokat,35 (1) , 28-37.
- Aruna, K., Shah, J., and Birmole, R.,2014. Production and partial characterization of alkaline protease from *Bacillus tequilensis* strains CSGAB 0139 isolated from spoiled cottage cheese. *Int J Appl Biol Pharm*, 5, 201-21.
- Auricchio, S., Barone, M. V., and Troncone, R., 2004. Dietary Proteins and Mechanisms of Gastrointestinal Diseases: Gliadin as a Model. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 39, S738-S739.
- Bairoch, A., 2000. "The Enzyme database in 2000" (PDF). *Nucleic Acids Res. Cilt 28*, s. 304-305. doi: 10. 1093/nar/28.1.304. PMID 10592255.
- Bajaj, BK., and Singh, NP., 2010. Production of xylanase from an alkali tolerant *Streptomyces spp.* 7b under solid-state fermentation, its purification, and characterization. *Appl Biochem Biotechnol*, 162, 1804-18.
- Bamforth, CW., 2009. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. *J Cereal Sci.*, 50(3), 353–7.
- Bardakcı, F., Yenidünya., A.F., ve Yıldırım, N., 2009. Gen Klonlama ve DNA analizi. Nobel yayın, Ankara.
- Bingley, PJ., Williams, AJK., Norcross, AJ., Unsworth, D.J., Lock, R.J., Ness, AR., and Jones, RW., 2004. Undiagnosed coeliac disease at age seven: population based prospective birth cohort study. *BMJ*, 328, 322-3.
- Bode, S., and Gudmand-Hoyer, E., 1994. Evaluation of gliadin antibody test for diagnosis coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*, 29, 148-153.
- Burgin-Wolff, A., Gaze, H., Hadziselimovic, F., Huber, H., Lentze, MJ., Nusslé, D., and Reymond-Berthet, C., 1991. Antigliaden and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. *Arch Dis Child*, 66, 941-945.
- Camacho, NA., and Aguilar, OG., 2003. Production, purification and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus spp.* and its application in baking. *Appl Biochem Biotechnol*, 104(3), 159–72.
- Capiralla, H., Hiroi, T., Hirokawa, T., and Maeda, S., 2002. Purification and characterization of a hydrophobic amino acid specific endopeptidase from *Halobacterium halobium* S9 with potential, *Process Biochem*, 38, 571–579.

- Catassi, C., Räscher, IM., Gandolfi, L., Pratesi, R., Fabiani, E., El Asmar, R., Frijia, Bearzi, M I., and Vizzoni, L., 1999. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet*, 354, 647-8.
- Catassi, C., and Fasano, A., 2008a. Celiac disease. In E. K. Arendt and F. D. Bello(Eds.), *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*, (pp. 1-27). San Diego: Academic Press.
- Catassi, C., and Fasano, A., 2008b. Celiac disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24(6), 687-691.
- Cavaletti, L., Carrano, L., Abbondi, M., Brunati, M., and Taravella, A., 2014. New Proteases Able to Hydrolyze Gluten Peptides and Proteins at Acidic pH, from the *Actinomyces actinoallomurus*. Google Patents.
- Cech, T., 2000. "Structural biology. The ribosome is a ribozyme". *Science*. 289 (5481), s. 878-9. doi: 10. 1126/science.289.5481.878. PMID 10960319.
- Chorzelski, TP., Sulej, J., Tschorzewska, H., Jablonska, S., Beutner, E H., and Kumaret V., 1983. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Ann N Y Acad Sci*, 420, 325-329.
- Ciclitira, PJ., Ellis, HJ., and Lundin KE, A., 2005. Gluten-free diet-what is toxic? *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 19, 359–371.
- Codex Alimentarius Commission. 2008. Draft Revised Codex Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten (ALINORM 08/31/26). Rome, Italy. Appendix III, 50-51.
- Comino, I., de Lourdes Moreno, M., Real, A., Rodríguez-Herrera, A., Baro, F., and Sousaet, C., 2013. The gluten-free diet: testing alternative cereals tolerated by celiac patients. *Nutrients*, 5, 4250- 4268.
- Crabbe, PA., and Heremans, JF., 1967. Selective IgA deficiency with steatorrhea. *Am J Med*, 42, 319-325.
- Cumbee, B., Hildebrand, DF., and Addo, K., 1997. Soybean flour lipoxygenase isozymes effects on wheat flour dough rheological and bread making properties. *J Food Sci*, 62(2), 281-3.
- Damhus, T., Kaasgaard, S., and Olsen, HS., editors. 2013. Bagsvaerd, Denmark: Novozymes A/S; Available from: https://mycourses.aalto.fi/pluginfile.php/102056/mod_folder/content/0/Enzymes_at_work.pdf?forcedownload=1 (12.04.2018).
- De Maria, L., Vind, J., Oxenbøll, KM., Svendsen, A., and Patkar, S., 2007. Phospholipases and their industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74, 290–300.
- De Souza, PM., and e Magalhães, PO., 2010. Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Braz J Microbiol*, 41(4), 850-61.
- Deng, L., Wang, Z., Yang, S., Song, J., Que, F., Zhang, H., and Feng, F., 2016. Improvement of functional properties of wheat gluten using acid protease from *Aspergillus usarii*. *PLoS ONE*, 11, e0160101.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vincenzi, M., Giovannini, C., and Faccia, M., 2002. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (2), 623–633.
- Di Sabatino, A., and Corazza, G. R., 2009. Coeliac disease. *The Lancet*, 373(9673), 1480-1493.

- Dissanayake, A. S., Truelove, S. C., and Whitehead, R., 1974. Lack of Harmful Effect of Oats on Small-intestinal Mucosa in Coeliac Disease. *British Medical Journal*, 4(5938), 189-191.
- Edens, L., Dekker, P., Van der Hoeven, R., Deen, F., Roos de, A., and Floris, R., 2005. Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates, *J. Agric. Food Chem*, 53, 7950–7957.
- Erdil, A., ve Ateş Y., 2005. Gluten Enteropatisinde Son Gelişmeler. *Güncel Gastroenteroloji*. 9 (1): 18–28.
- Fasano, A., and Catassi, C., 2001. Current Approaches to Diagnosis and Treatment of Celiac Disease: An Evolving Spectrum. *Gastroenterology*, 120, 636–651.
- Ferreira, M., Davies, SL., Butler, M., Scott, D., Clark, M., and Kumaret, P., 1992. Endomysial antibody: Is it the best screening test for coeliac disease *Gut*, 33,1633-1638.
- Ferrer, M., Martí'nez-Martí'nez, M., Bargiela, R., Streit, WR., Golyshina, OV., and Golyshin, PN., 2016. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends. *Microb Biotechnol*, 9, 22-34.
- Fink, CS., Hamosh, P., and Hamosh, M., 1984. Fat digestion in the stomach: Stability of lingual lipase in the gastric environment. *Pediatr Res.*,18(3),248-54.
- Fülöp, V., Böcskei, Z., and Polgár, L., 1998. "Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis". *Cell*. 94 (2), 161–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81416-6. PMID 9695945.
- Fülöp, V., Szeltner, Z., and Polgár, L., 2000. "Catalysis of serine oligopeptidases is controlled by a gating filter mechanism". *EMBO Rep*. 1 (3), 277–81. doi: 10.1093/embo-reports/kvd048. PMC 1083722. PMID11256612.
- Galante, YM., Monteverdi, R., Inama, S., Caldini, C., De Conti, A., Lavelli, V., and Bonomi, F., 1993. New applications of enzymes in wine making and olive oil production. *Italian Biochem Soc Trans*, 4: 34.
- Gallagher, E., Gormley, T. R., and Arendt, E. K., 2004. Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3-4), 143-152.
- Gallego, Custodio MV., Otamendi, FP., Vidal, DR., and Vallés Alventosa, S., 1996. Production and characterization of an *Aspergillus terreus* α -L-rhamnosidase of oenological interest. *Z Lebensm Unters Forsch*,203(6),522-7.
- Gänzle, M. G., Lopenen, J., and Gobbetti, M., 2008. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science and Technology* 19: 513–521.
- Garrett, RH., and Grisham, CM., 1999. *Biochemistry*, Second Edition Saunders College Publishing. 426-427. ISBN 0-03-022318-0.
- Gass, J., Ehren, J., Strohmeier, G., Isaacs, I., and Khosla, C., 2005. Fermentation, purification, formulation, and pharmacological evaluation of a prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus*: implications for celiac sprue therapy, *Biotechnol. Bioeng*, 92, 674–684.
- Gass, J., Bethune, M. T., Siegel, M., Spencer, A., and Khosla, C., 2007. Combination enzyme therapy for gastric digestion of gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology*, 133, 472-480.
- Gerits, LR., Pareyt, B., Decamps, K., and Delcour, JA., 2014. Lipases and their functionality in the production of wheat-based food systems. *Compr Rev Food Sci Food Saf.*,13(5), 978-89.

- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., and Delcour, J. A., 2005. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 12–30.
- Gordon, S. R., Stanley, E. J., Wolf, S., Toland, A., Wu, S. J., Hadidi, D., Mills, J. H., Baker, D., Pultz, I. S., and Siegel, J. B., 2012. Computational design of an α -gliadin peptidase. *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 20513.
- Grassin, C., and Fauquembergue, P., 1996. Fruit juices. In: Godfrey T, West S, editors. *Industrial enzymology*. London, UK: MacMillan Pres, pp. 226-64.
- Green, PH., and Cellier, C., 2007. Celiac disease. *N Engl J Med*; 375, 1731-43.
- Guda, C., Zhang, X., McPherson, D.T., Xu, J., Cherry, J.H., Urry, D.W., and Daniell, H., 1995. Hyper expression of an environmentally friendly synthetic polymer gene. *Biotechnol. Lett.*, 17, 745–750.
- Guerdrum, L. J. and Bamforth, C. W., 2012. Prolamins levels throughs brewing and the impact of prolyl endoproteinase. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, 70 (1), 35-38.
- Guerrand, D., 2017. Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries. *OCL*, 24:D403.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., and Rai, V., 2013. broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Res Int*. Article ID 329121.
- Hamid, M., and Khalil-ur, Rehman., 2009. Potential applications of peroxidases. *Food Chem.*, 115, 1177–86.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *J. Mol Biol.*, 166, 557–580.
- Hanahan, D., 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA cloning: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, United Kingdom, 1, 109-135.
- Hanft, F., and Koehler, P., 2006. Studies on the effect of glucose oxidase in bread making. *J Sci Food Agric.*, 86, 1699–704.
- Holm, KA., 1995. Automated determination of microbial peroxidase activity in fermentation samples using hydrogen peroxide as the substrate and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) as the electron donor in a flow injection system. *Analyst.*, 120(8), 2101-5.
- Holm, K., Maki, M., Vuolteenaho, N., Mustalahti, K., Ashorn, M., Ruuska, T., and Kaukinen, K., 2006. Oats in the treatment of childhood coeliac disease: a 2-year controlled trial and a long-term clinical follow-up study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 23(10), 1463-1472.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28.
- İşleroğlu, H., Dirim, S. N., Ertekin ve F. K., 2009. Gluten içermeyen, hububat esaslı alternatif ürün formülasyonları ve üretim teknolojileri. *GIDA*, 34, 29–36.
- Jaeger, KE., and Reetz, MT., 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 16, 396-403.
- Janssen, G., Christis, C., Kooy-Winkelaar, Y., Edens, L., Smith, D., van Veelen, P., and Koning, F., 2015. Ineffective degradation of immunogenic gluten epitopes by currently available enzyme supplements. *PLOS One*, 10, e0128065.
- Jarho, EM., Venäläinen, JI., and Poutiainen, Svd., 2007. "2 (S) - (Sikloalk-1-enekarbonil) -1- (4-fenil-bütanoil) pirolidinler ve prolyl oligopeptidaz inhibitörleri

- olarak 2 (S) - (aroil) -1- (4-fenilbütanoil) pirolidin". Bioorg. Med. Chem. 15 (5): 2024-31. doi: 10. 1016 / j.bmc.2006.12.036. PMID 17215128.
- Jooyendeh, H., Kaur, A., and Minhas, KS., 2009. Lipases in dairy industry: A review. J Food Sci Tech., 46(3), 181-9.
- Kabashima, T., Fujii, M., Meng, Y., Ito, K., and Yoshimoto, T., 1998. Prolyl endopeptidase from *Sphingomonas capsulata*: isolation and characterization of the enzyme and nucleotide sequence of the gene, Arch. Biochem. Biophys. 358, 141–148.
- Kánai, K., Arányi, P., Bocskei, Z., Ferenczy, G., Harmat, V., Simon, K., Batori, S., Naray-Szabo & Hermecz, I. (2008). Prolyl oligopeptidase inhibition by N-acyl-pro-pyrrolidine-type molecules. Journal of medicinal chemistry, 51(23), 7514-7522
- Kanatani, A., Yoshimoto, T., Kitazono, A., Kokubo, T., and Tsuru, D., 1993. Prolyl endopeptidase from *Aeromonas hydrophila*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene and characterization of the expressed enzyme, J. Biochem., 113, 790–796.
- Kang, C., Yu, XW., and Xu, Y., 2014. Purification and characterization of a prolyl endopeptidase isolated from *Aspergillus oryzae*. J Ind Microbiol Biotechnol., 41, 49–55.
- Kang, C., Yu, XW., and Xu, Y., 2015. Cloning and expression of a novel prolyl endopeptidase from *Aspergillus oryzae* and its application in beer stabilization J Ind Microbiol Biotechnol. 42,263–272.
- Kaplan, M., Kuk, S., Özdarendeli, A., Bulut, Y., ve Kalkan, A., 2002. Fasciola hepatica cathepsin L1 geninin klonlanması ve rekombinant plazmitlerin polimeraz zincir reaksiyon taraması ile belirlenmesi. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 26, 388-392.
- Khlebnikova, NN., Krupina, NA., Bogdanova, NG., Zolotov, NN., and Kryzhanovskii, GN., 2009. "Effects of the prolylendopeptidase inhibitor benzyloxycarbonyl-methionyl-2 (S)-cyanopyrrolidine on the development of experimental depressive syndrome in rats". Exp. Biol. Med. 147 (1): 26-30. doi: 10. 1007 / s10517-009-0458-6. PMID 19526123.
- Khlebnikova, NN., Krupina, NA., Kushnareva, EY., Zolotov, NN., and Kryzhanovskii, GN ., 2012. "Effect of imipramine and prolyl endopeptidase inhibitor benzyloxycarbonyl-methionyl-2(S)-cyanopyrrolidine on activity of proline-specific peptidases in the brain of rats with experimental anxious-depressive syndrome". Bull Exp Biol Med. 152 (4): 409–12. doi: 10. 1007/s10517-012-1540-z. PMID 22803098.
- Kilander, Af., Nilsson, LA., and Gillberg, L., 1987. Serum antibodies to gliadin in coeliac disease after gluten with drawal. Scand J Gastroenterol., 22, 29-34.
- Knorr, V., Wieser, H., and Koehler, P., 2016. Production of gluten-free beer by peptidase treatment. European Food Research and Technology, 242, 1129–1140.
- Kona, RP., Qureshi, N., and Pai, JS., 2001. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. Bioresour Technol, 78, 123-6.
- Kömen, G., 2010. Structural changes of gliadins during sourdough fermentation as apromising approach to gluten free-diet. Yüksek Lisans Tezi, İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü Üniversitesi, İzmir.
- Krishnapura, PR., Belur, PD., and Subramanya, SA., 2016. Critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases. Crit Rev Microbiol, 42, 720-37.

- Leffler, D., Edwards-George, J., Dennis, M., Schuppan, D., Cook, F., Franko, D., Blom-Hoffman, J., and Kelly, C., 2008. Factors that Influence Adherence to a Gluten-Free Diet in Adults with Celiac Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 53(6), 1573-1581.
- León, F., Sánchez, L., Camarero, C., Camarero, C., and Roy, G., 2005. Immunopathogenesis of celiac disease. *Inmunología*, 24, 313-325.
- Lerner, A., 2010. New therapeutic strategies for celiac disease. *Autoimmunity Reviews*, 9(3), 144-147.
- Lilley, D., 2005. "Structure, folding and mechanisms of ribozymes". *Curr Opin Struct Biol*. 15 (3), s. 313-23. doi: 10. 1016/j.sbi.2005.05.002. PMID 15919196.
- Lindfors, K., Blomqvist, T., Juuti-Uusitalo, K., Stenman, S., Venäläinen, J., Mäki, M., and Kaukinen, K., 2008. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clinical & Experimental Immunology*, 152(3), 552-558.
- Lindfors, K., Koskinen, O., and Kaukinen, K., 2011. An update on the diagnosis of celiac disease. *Int Rev Immunol*, 30, 185-96.
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., and Iverson, BL., 2013. Commercial proteases: Present and future. *FEBS Lett*, 587, 1155-63.
- Lopez, M., and Edens, L., 2005. Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline specific endoprotease from *Aspergillus niger*, *J. Agric. Food Chem*, 53, 7944–7949.
- Loponen, J., 2006. Prolamin degradation in sourdough. academic dissertation, Department of Food Technology, University of Helsinki, Helsinki.
- Lundin, K. E. A., Nilsen, E. M., Scott, H. G., Løberg, E. M., Gjøen, A., Bratlie, J., Skar, V., Mendez, E., Løvik, A., and Kett, K., 2003. Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut*, 52(11), 1649-1652.
- Maes, M., Goossens, F., Scharpé, S., Calabrese, J., Desnyder, R., and Meltzer, HY., 1995. Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia: effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs". *Psychiatry Res*. 58 (3): 217–25. doi:10.1016/0165-1781(95)02698-V. PMID 8570777.
- Mäki M., and Collin P., 1997. Coeliac disease. *Lancet* 349:1755–1759.
- Mandal, A., 2015. Review on microbial xylanases and their applications. *Int J Life Sci*;4,178-87.
- Marsh, M. N., Morgan, S., Ensari, A., Wardle, T., Lobley, R., Mills, C., and Auricchio, S., 1995. In vivo activity of peptide 31–43, 44–55, 56–68 of alfa-gliadin in gluten sensitive enteropathy (GSE). *Gastroenterology*, 108, A871.
- Martínez-Anaya, MA., and Jiménez, T., 1997. Functionality of enzymes that hydrolyse starch and non-starch polysaccharide in breadmaking. *Z Lebensm Unters Forsch*, 205(3), 209-14.
- Matysiak-Budnik, T., Candalh, C., Cellier, C., Dugave, C., Namane, A., Vidal-Martinez, T., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M., 2005. Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*, 129, 786-796.
- Mayer ,M., Greco, L., Troncone, R., Grimaldi, M., and Pansa, G., 1989. Early prediction of relapse during gluten challenge in childhood celiac disease. *J.Pediatr Gastroenterol Nutr*; 8, 474-479.

- Mearin, ML., 2007. Celiac disease among children and adolescents. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 37(3), 86-105.
- Melissis, SC., Papageorgiou, AC., Labrou, NE., and Clonis, YD., 2010. Purification of M-MLVH-RT on 9-Aminoethyladenine (1,6-diamine-hexane)-triazine selected from a Combinatorial Library of dNTP-Mimetic Ligands. *Journal of Chromatographic Science*, 48, 496-502.
- Meresse, B., Ripoché, J., Heyman, M., and Cerf-Bensussan, N., 2009. Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunol*, 2, 8-23.
- Miguel, ASM., Martins-Meyer, TS., Veríssimo da Costa Figueiredo, E., Lobo, BWP., and Dellamora-Ortiz, GM., 2013. Enzymes in bakery: Current and future trends. In: Muzzalupo I, editor. *Food Industry*. Rijeka, Croatia: InTech.
- Mika, N., Gorshkov, V., Spengler, B., Zorn, H., and Rühl, M., 2015. Characterization of novel insect associated peptidases for hydrolysis of food proteins. *European Food Research and Technology*, 240, 431-439.
- Mikhailova, RV., Shishko, ZhF., Yassenko, MI., and Lobanok, AG., 2000. Effect of culture conditions on extracellular glucose oxidase production by *Penicillium adametzii* strain BIM-90. *Mikol Fitopatol.*;34,48-53.
- Mitea, C., Havenaar, R., Drijfhout, J.W., Edens, L., Dekking L., and Koning, F., 2008. Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease, *Gut* 57, 25–32.
- Momeni, N., Nordström, BM., Horstmann, V., Avarseji, H., and Sivberg, BV., 2005. "Alterations of prolyl endopeptidase activity in the plasma of children with autistic spectrum disorders". *BMC Psychiatry*. 5: 27. doi:10.1186/1471-244X-5-27. PMC 1190193. PMID 15932649.
- Montserrat, V., Bruins, M-J., Edens, L., and Koning, F., 2015. Influence of dietary components on *Aspergillus niger* prolyl endoprotease mediated gluten degradation. *Food Chemistry*, 174, 440–445.
- Morain, P., Boeijinga, PH., Demazières, A., De Nanteuil, G., and Luthringer, R., 2007. "Psychotropic profile of S 17092, a prolyl endopeptidase inhibitor, using quantitative EEG in young healthy volunteers". *Neuropsychobiology*. 55 (3–4): 176–83.
- Murray, JA., Van Dyke, C., Plevak, MF., Dierkhising, RA., Zinsmeister, AR., and Melton, LJ III., 2003. Trends in the identification and clinical features of celiac disease in a North American community, 1950-2001. *Clin Gastroenterol Hepatol* ; 1:19-27.
- Müller, D., 1928. Studies on the new enzyme glucose oxidase. I. *Biochem Z*, 199, 136-70 (in German).
- Nelson, D., and Cox, M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Palme Yayıncılık, 1119- 1120, Türkiye.
- Novagen
http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-22b_map.pdf
 (10.04.2019).
- Oliveira, EB., Martins, AR., and Camargo, AC., May 1976. "Isolation of brain endopeptidases: Influence of size and sequence of substrates structurally related to bradykinin". *Biochemistry*. 15 (9)196774. doi: 10. 1021/bi00654a026. PMID 5120.

- ONeill, J., 2010. Gluten-free foods: Trends, challenges, and solutions. *Cereal Food World*, 55, 220–223.
- Örün, E., 2005. Çölyak Hastalığı (Gluten duyarlı enteropati, Çölyak sprue). *Klinik Pediatri*, 4(2), 63-66.
- Özüğür, G., 2011. Glutensiz Ekmeklerde Ekşi Hamur Kullanımının Kaliteye Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- Panda, T., and Gowrishankar, BS., 2005. Production and applications of esterases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67, 160–9.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, CR., Soccol, VT., Singh, D., and Mohan, R., 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem*, 31(Pt 2), 135-52.
- Panesar, PS., Kumari, S., and Panesar, R., 2010. Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Res.*, Article ID 473137.
- Patel, NS., Fung, SM., Zanichelli, A., Cicardi, M., and Cohn, JR., 2013. Ecallantide for treatment of acute attacks of acquired C1 esterase inhibitor deficiency. *Allergy Asthma Proc*, 34(1), 72-7.
- Pedrolli, DB., Monteiro, AC., Gomes, E., and Carmono, EC., 2009. Pectin and pectinases: Production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnol J*, 3, 9-18.
- Peräaho, M., Kaukinen, K., Mustalahti, K., Vuolteenaho, N., Mäki, M., Laippala, P., and Collin, P., 2004. Effect of an oats containing gluten-free diet on symptoms and quality of life in coeliac disease. A randomized study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 39(1), 27-31.
- Pivarnik, LF., Senecal, AG., and Rand, AG., 1995. Hydrolytic and transgalactosylic activities of commercial β -galactosidase (lactase) in food processing. *Adv Food Nutr Res*, 38, 1-102.
- Puri, M., and Banerjee, UC., 2000. Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnol Adv*, 18, 207-17.
- Puri, M., Sharma, D., Barrow, JC., and Tiwary, AK., 2012. Optimization of novel method for the extraction of steviolides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chem*, 132, 1113–20.
- Pyle, GG., Paso, B., Anderson, BE., Allen, DD., Marti, T., Li, Q., S, M., Khosla, C., and Gray, GM., 2005. Effect of pretreatment of food gluten with prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 3, 687-94.
- Rao, MB., Tanksale, AM., Ghatge, MS., and Deshpande, VV., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(3), 597–635.
- Rashid, M., Butzner, D., Burrows, V., Zarkadas, M., Case, S., Molloy, M., Warren, R., Pulido, O., and Switzer, C., 2007. Consumption of pure oats by individuals with celiac disease: A position statement by the Canadian Celiac Association. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 21(10), 649–651.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, SB., Abraham, A., Mathew, AK., Madhavan, A., Rebello, S., and Pandey, A., 2018. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technol. Biotechnol*, 56 (1), 16-30.
- Ravikumara, M., Tuthill, DP., and Jenkins, HR., 2006. Clinical presentation of coeliac disease. *Arch Dis Child*, 91, 969-71.

- Rebello, S., Anju, M., Aneesh, EM., Sindhu, R., Binod, P., and Pandey, A., 2017. Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: An overview. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 16, 381-94.
- Regaldo, C., García-Almendárez, BE., and Duarte-Vázquez, MA., 2004. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem Rev*, 3(1-2), 243-56.
- Renugopalakrishnan, V., Garduno-Juarez, R., Narasimhan, G., Verma, C.S., Wei, X., and Li, P., 2005. Rational design of thermally stable proteins: relevance to bionanotechnology. *J Nanosci Nanotechnol*, 5 (11), 1759–1767.
- Riggle, H.M., and Fisher, M.A., 2009. Purification of a prolyl endopeptidase from *Aspergillus oryzae* and evaluation of its ability to digest gluten, Abstracts PapersAm.Chem.Soc.237(<http://oasys2.confex.com/acs/237nm/techprogram/P1239602.htm>).
- Rodríguez-Couto S., and Ángeles Sanromán, M., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *J Food Eng*, 76(3):291-302.
- Rosell, CM., Baro, F., Sousa, C., and Mena, MC., 2014. Cereals for Developing Gluten-Free Products and Analytical Tools for Gluten Detection, *J Cereal Sci*, 59, 354-364.
- Rosenberg, ZMM., 2006. Current trends of β -galactosidase application in food technology. *J Food Nutr Res*, 45(2), 47–54.
- Saadoun, I., Dawagreh, A., Jaradat, Z., and Ababneh, Q., 2013. Influence of culture conditions on pectinase production by *Streptomyces spp.* (strain J9). *Int J Life Sci Med Res*, 3, 148.
- Sajith, S., Priji, P., Sreedevi, S., and Benjamin, S., 2016. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *J Nutr Food Sci*, 6(1), 461.
- Schalk, K., Lang, C., Wieser, H., Koehler, P., and Scherf, KA., 2017. Quantitation of the immunodominant 33-mer peptide from α -gliadin in wheat flours by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Scientific Reports*, 7, 45092.
- Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M., Lang, M., Munaretto, C., and Ulas, S., 2013. BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. *Nucleic Acids Research*, 41, 764-772.
- Shahbazkhani, B., Malekzadeh, R., Sotoudeh, M., Moghadam, KF., Farhadi, M., Ansari, R., Elahyfar, A., and Rostami, K., 2003. High prevalence of coeliac disease in apparently healthy Iranian blood donors. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 15, 475-8.
- Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G., Sollid, LM., and Khosla, C., 2002. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297, 2275-9.
- Shetty, R., Vestergaard, M., Jessen, F., Hägglund, P., Knorr, V., and Koehler, P., 2017. Discovery, cloning and characterisation of proline specific prolyl endopeptidase, a gluten degrading thermo-stable enzyme from *Sphaerobacter thermophiles*. *Enzyme Microb Technol.* ; 107: 57–63. pmid: 28899487.
- Shewry, PR., (2009). Wheat. *J Exp Bot*, 60, 1537–1553.
- Saldamlı, İ., ve Temiz, A., 2007. Aminoasitler, peptitler ve proteinler, s. 223–286. In: *Gıda Kimyası* (Ed: İ. Saldamlı). Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.
- Salleh, AB., Razak, CNA., Rahman, RNZRA., and Basri M., 2006. Protease introduction. In: Salleh AB, Rahman RNZRA, Basri M, editors. *New lipases and proteases*. New York, NY, USA: Nova Science Publishers, Inc, pp. 23-39.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanghi, A., Garg, N., Gupta, VK., Mittal, A., and Kuhad, RC., 2010. One step purification and characterization of a cellulose free xylanase produced by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH. Braz J Microbiol, 41, 467-76.
- Schägger, H., and Von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry, 166(2), 368-379.
- Scherf, K. A., Wieser, H., and Koehler, P., 2018. Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. Food Research International, 110, 62-72.
- Schuppan, D., and Junker, Y., 2007 . Turning swords into plowshares transglutaminase to detoxify gluten. Gastroenterology, 133, 1025-1038.
- Schülein, M., 1988. Cellulases of *Trichoderma reesei*. Methods Enzymol, 160,234-42.
- Sharma, R., Chisti, Y., and Banerjee, UC., 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. Biotechnol Adv, 19, 627-62.
- Sharma, PK., and Chand, D., 2012. Production of cellulase free thermostable xylanase from *Pseudomonas spp.* XPB-6. Int Res J Biol Sci, 1(5), 31–41.
- Sindhu, R., Binod, P., and Pandey, A., 2016. α -Amylases. In: Pandey A, Negi S, Soccol CR, editors. Current developments in biotechnology and bioengineering - Production, isolation and purification of industrial products. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier B.V, pp. 3-24.
- Sindhu, R., Binod, P., Madhavan, A., Beevi, US., Mathew, AK., Abraham, A., Pandey, A., and Kumar, V., 2017. Molecular improvements in microbial α -amylases for enhanced stability and catalytic efficiency. Bioresour Technol, 245(Part B):1740-8.
- Singh, RS., Sooch, BS., and Puri, M., 2007. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. Bioresour Technol, 98, 2518-25.
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., and Mehta, PK., 2016. Microbial protease in commercial applications. J Pharm Chem Biol Sci, 4(3), 365-74.
- Sîrbu, T., 2011. The searching of active catalase producers among the microscopic fungi. An Univ Oradea Fasc Biol, 2, 164-7.
- Smith, A.D., Datta, SP., Howard Smith, G., Campbell, PN., Bentley, R., and McKenzie HA., 1997. Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology Oxford University Press. ISBN 0-19-854768-4.
- Socha, P., Mickowska, Barbara., Urminská, D., and Kačmárová, K., 2015. The Use of Different Proteases to Hydrolyze Gliadins. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 101-104.
- Soccol, CR., Rojan, PJ., Patel, AK., Woiciechowski, AL., Vandenberghe, LPS., and Pandey, A., 2005. Glucoamylase. In: Pandey, A., Webb, C., Soccol, CR., Larroche, C., editors. Enzyme Technology. New Delhi, India: Asiatech Publishers Inc, pp. 221-38.
- Sollid, LM., and Jabri B., 2005. Is celiac disease an autoimmune disorder? Curr Opin Immunol 17: 595-600.
- Sood, A., Midha, V., Sood, N., and Malhotra V., 2003. Adult celiac disease in northern India. Indian J Gastroenterol; 22: 124-6. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 2.

- Sridhar, V.R., Hughes, J.E., Welke, D.L., Broadbent, J.R., and Steele, J.L., 2005. Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides, *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3025–3032.
- Stepniak, D., Spaenij-Dekking, L., Mitea, C., Moester, M., de Ru, A., Baak-Pablo, R., van Veelen, P., Edens, L., and Koning, F., 2006. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(4), G621-629.
- Szwajcer-Dey, E., Rasmussen, J., Meldal, M., and Breddam, K., 1992. Proline-specific endopeptidases from microbial sources: isolation of an enzyme from a *Xanthomonas* spp, *J. Bacteriol.* 174, 2454–2459.
- Şahin, B., 2019. Glutensiz Buğday Ekmegi Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin.
- Tapre, AR., and Jain, RK., 2014. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *Int Food Res J*, 21, 447-53.
- Tatar, G., Elsurur, R., Simsek, H., Balaban, YH., Haşcelik, G., Özcebe, OI., Büyükasik, Y., ve Sokmensuer, C., 2004. Screening of tissue transglutaminase antibody in healthy blood donors for celiac disease screening in the Turkish population. *Dig Dis Sci*, 49, 1479-84.
- Trancone, R., and Jabri, B., 2011. Celiac disease and gluten sensitivity. *J Intern Med*, 269, 582-90.
- Tucker, GA., and Woods, LFJ., editors. 1995. *Enzymes in food processing*. Boston, MA, USA: Springer.
- Türksoy, S., ve Özkaya, B., 2006. Gluten ve Çölyak Hastalığı, s. 807–810. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, 24-26 Mayıs, Bolu.
- Ulusoy, M., Feyizoglu, H., Turan, M., Yılmaz, M., Yigit, N., Gürkan, Y., ve Kuyubası, Z., 2002. Gluten sensitif enteropati. *Güncel Gastroenteroloji*, 6 (3), 151–158.
- Van der Borgh, A., Goesaert, H., Veraverbeke, W. S., and Delcour, J., 2005. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. *Journal of Cereal Science*, 41 (3), 221–237.
- Van der Maarel, MJEC., van der Veen, B., Uitdehaag, JCM., Leemhuis, H., and Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J Biotechnol*, 94, 137-55.
- Van Oort, M., 2010. Enzymes in food technology introduction. *Enzymes Food Technol*: 14.
- Vanhoof, G., Goossens, F., Hendriks, L., De Meester, I., Hendriks, D., Vriend, G., Van Broeckhoven, C., and Scharpe, S., 1994. "Cloning and sequence analysis of the gene encoding human lymphocyte prolyl endopeptidase". *Gene*. 149 (2): 363–6. doi:10.1016/0378-1119(94)90177-5. PMID 7959018.
- Walter, R., Simmons W.H., and Yoshimoto, T., 1980. Proline-specific endo and exopeptidases, *Mol. Cell. Biochem.* 30 111–127.
- Walter, T., Wieser, H., and Koehler, P., 2014. Degradation of gluten in wheat bran and bread drink by means of a proline-specific peptidase. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 4 (5), 1-6.

- Walter, T., Wieser, H., and Koehler, P., 2015. Degradation of gluten in rye sourdough products by means of a proline-specific peptidase. *European Food Research and Technology*, 240, 517–524.
- West, J., Logan, RFA., Hill, PG., Lloyd, A., Lewis, S., Hubbard, R., Reader, R., Holmes, GKT., and Khaw, KT., 2003. Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England. *Gut*, 52, 960-5.
- Wieser, H., 1995. The precipitating factor in coeliac disease. *Baillière's Clinical Gastroenterology*, 9(2), 191-207.
- Wieser, H., and Kieffer, R., 2001. Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours Determined on a Micro-scale. *Journal of Cereal Science*, 34(1), 19-27.
- Wołosowska, S., and Synowiecki, J., 2004. Thermostable β -glucosidase with a broad substrate specificity suitable for processing of lactose-containing products. *Food Chem*, 85, 181-7.
- Xianchang, X., Di, Y., Fuping, L., Yanlin, G., and Yu, L., 2009. Cloning of proline-specific endoprotease gene of *Aspergillus niger* and expression in *Pichia pastoris*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 39, 7–12.
- Yağmur, G., 2013. Ekşi hamur fermentasyonunda etkili olan laktik asit bakterilerinin ve mayaların belirlenmesi ve bunlardan elde edilen sıvı ekşi hamurun ekmek kalitesi üzerine etkisinin araştırılması. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Yoshimoto, T., Walter, R., and Tsuru, D., 1980. Proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium*, purification and properties, *J. Biol. Chem*, 10, 4786–4792.
- Zhu, Z., Momeu, C., Zakhartsev, M., and Schwaneberg, U., 2006. Making glucose oxidase fit for biofuel cell applications by directed protein evolution. *Biosens Bioelectron*, 21, 2046–51. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.11.018>.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı:	Belma ŞENOL
Doğum Tarihi ve Yeri:	24.12.1976- Sivas / Zara
Yabancı Dili:	İngilizce
e-mail:	belma-senol@hotmail.com bsenol@cumhuriyet.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü	03.07.1998
Yüksek lisans	Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2000-2001	81 Naturel Yemekçilik/Mersin	Gıda Mühendisi
2001-2002	Kiler Bakliyat ve Prenses Küp Şekerleri/Mersin	Gıda Mühendisi
2001-2002	Meyfab Yemekçilik/Mersin	Gıda Mühendisi
2003-2004	İdeal Yemekçilik/Mersin	Gıda Mühendisi
2000-2004	Fırınlr ve pastaneler	Sorumlu yöneticilik
2005-Devam ediyor	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Zara Ahmet Çuhadaroğlu MYO/ Zara- Sivas	Öğretim Görevlisi