



Mikrobiyal Dipeptidil Peptidaz IV'ün Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi

Sevda ARISOY¹ Özlem ÜSTÜN AYTEKİN^{1*}

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Üsküdar, İstanbul
*e-mail: ozlem.aytekin@sbu.edu.tr

Alındığı tarih (Received): 22.11.2017

Kabul tarihi (Accepted): 26.02.2018

Online Baskı tarihi (Printed Online): 20.03.2018

Yazılı baskı tarihi (Printed): 30.04.2018

Öz: Dipeptidil peptidaz IV (EC 3.4.14.5; DPPIV) enzimi tüm doku, organ ve sistemlerin düzenlenmesinde rol alan, nörolojik, immünolojik ve gastroenterolojik açıdan araştırılan önemli bir enzimdir. DPPIV enzimi pek çok memeli, bitki, böcek ve mikrobiyal hücrelerden regüle edici enzim olarak elde edilmektedir. DPPIV enziminin sindirim enzimi eksikliği, otizm, çölyak ve Asperger sendromu gibi hastalıklarda gıda takviyesi olarak kullanımıyla son yıllarda ticari olarak üretilmesi artmıştır. DPPIV enzim kaynağı olarak hücre-dışı enzim ekspresyonu yapan fungal kaynaklar tercih edilmesine rağmen bakterilerin enzim üretim verimliliği funguslara göre daha fazla olduğundan son yıllardaki ticari enzim üretimlerinde bakteriler tercih edilmektedir. Bu çalışmada, koleksiyon kültüründen satın alınmış bir laktik asit bakterisi, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* (*L. lactis*), enzim üreticisi mikroorganizma olarak seçilmiştir. *L. lactis*, kazein proteinini hidrolizlemek için endo- ve ekzo-peptidazlar eksprese eder. DPPIV enzimi de bunlardan biridir. Hücre-içi DPPIV enzimi, üretiminden sonra saflaştırılmış ve ardından enzim karakterizasyonunu yapmak için kinetik özellikleri incelenmiştir. Sonuçlar, Gly-Pro-pNA substratı için optimum sıcaklığın 40 °C ve optimum pH'nın 8,0 olduğunu göstermektedir. Saflaştırılan enzimin Gly-Pro-pNA substratına ilgisi olduğu bulunmuştur. Enzim, Hg⁺², Zn⁺², Ca⁺², Fe⁺² ve Mg⁺² iyonları tarafından sırası ile inhibe edilmiştir. Enzim, Diprotin A tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir. Jelatin inhibisyonu fenilmetilsulfonyl florid (PMSF) inhibisyonu ile yakın bulunmuş ve etilendiamin tetra asetik asitin (EDTA) inhibisyonu etkisi gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: Dipeptidil Peptidaz IV, enzim inhibisyonu, enzim kinetiği, *Lactococcus lactis* spp. *lactis*

Determination of Kinetic Parameters of Microbial Dipeptidyl Peptidase IV

Abstract: Dipeptidyl peptidase IV (EC 3.4.14.5; DPPIV) is an important enzyme that has role for regulation of tissue and organ systems and been investigated for neurological, immunological and gastroenterological aspects. DPPIV is expressed as regulator enzyme by mammalian, plant, insect and microbial cells. Recently, commercial DPPIV enzyme production has increased via using as dietary supplement for people who suffer from deficiency of digestion enzyme, autism, celiac and Asperger syndrome. Although fungal resources which are expressing extracellular enzyme were preferred to produce DPPIV, production of DPPIV is recently performed by bacteria; because, productivity values are generally higher in bacteria than fungus. In this study, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* (*L. lactis*) was used as an enzyme producer microorganism. *L. lactis* expresses endo- and exo-peptidases which DPPIV is one of them to hydrolyze casein. Intracellular DPPIV enzyme was purified after the production and some of kinetic properties were investigated for enzyme characterization. Results indicated that the optimum pH and temperature were 8.0 and 40°C with Gly-Pro-pNa as the substrate, respectively. Purified enzyme showed a strong preference for Gly-Pro-pNa as substrate. The enzyme was inhibited by Hg⁺², Zn⁺², Ca⁺², Fe⁺² and Mg⁺², respectively. It is important and serin protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). The enzyme was strongly inhibited by Diprotin A. Inhibition of the enzyme by gelatin and PMSF were found as similar, and no inhibition was detected with ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA).

Keywords: Dipeptidyl Peptidase IV, enzyme inhibition, enzyme kinetic, *Lactococcus lactis* spp. *Lactis*

1. Giriş

Dipeptidil peptidaz IV (EC 3.4.14.5; DPPiV) enzimi, insan vücudundaki pek çok sistemin regüle edilmesinden sorumlu ve bütün hücreler tarafından sentezlenebilen hidrolaz grubu bir serin proteazdır ve literatürde merkezi sinir sistemine olumsuz etkisi olan opioid peptitler ile ilişkilendirilmiştir. Opioid peptitler, gıdaların işlenmesi sırasında açığa çıkan morfin yapıları olarak bilinmektedir. Süt, tahıl ve sebze gibi gıdaların işlenmesi, fermentasyonu ya da sindirimi ile açığa çıkan opioid peptitler, bağırsaklar tarafından emilip kan-beyin bariyerine ulaşmakta ve sindirim enzimi eksikliği olan bireylerde merkezi sinir sisteminin baskılanmasıyla davranış bozukluklarına sebep olmaktadır. Beslenmemizde yer alan süt, yumurta, tahıl, sebze, et ve tavuk eti proteinleri gibi pek çok protein molekülü opioid reseptör ligandları gibi davranabilen bu morfin yapılarını içermektedir (Noni ve ark. 2009).

İlk tespit edilen opioid peptit, süt proteininden elde edilen β -kazomorfin' dir (Pihlanto leppala, 2001). β -kazein proteininin hidrolizi sonucu ortaya çıkan β -kazomorfin 'Tyrtophan-Proline-Phenylalanine-Proline-Glycine-Proline-Isoleucine' peptit dizisi olarak bilinir (Noni ve ark. 2009). Kazomorfinler (β -kazomorfin-5,-7), insanlarda inek sütü tüketiminden sonra ince bağırsakta belirlenmiştir (Kınık ve Gürsoy 2002). β -kazomorfin, vücuttaki opioid reseptörlere bağlanarak morfine benzer opioid agonist etki göstermektedir (Saatçi ve ark. 2011). Gluteomorfin ise buğday, çavdar, arpa, yulaf ve türevlerinde glutenin hidrolizi sonucu oluşan bir biyoaktif peptittir ve aminoasit dizilişi 'Tyrtophan-Proline-Glutamine-Proline-Glutamine-Proline-Phenylalanine' şeklindedir. Sağlıklı bir insanda gıda alımı ile birlikte gastrointestinal sistemdeki endokrin L ve K hücrelerinden sırası ile inkretin hormonları olan glukagon benzeri peptit (GLP1) ve glukoz bağımlı insulotropik peptit (GIP) salgılanır ve pankreatik β hücrelerini uyarıp, insülin salınımını arttırarak glukagon sekresyonunu baskılar. Sonuç olarak gastrik boşalmayı engelleyerek iştahı azaltır. İnkretin hormonlarının konsantrasyonları öğünü

takiben dakikalar içinde artmakta ve daha sonra hızlı bir şekilde dolaşımda bulunan DPPiV tarafından yıkılmaktadırlar. Bu yıkım gerçekleşmezse insülinin üretimi artmakla beraber glukagon sekresyonu ve glukoz üretimi inhibe olmakta, bu da vücuttaki hazır glukozun kullanımını arttırarak β hücrelerini farklılaştırmaktadır (Sentandreu and Toldra 2001; Brandt ve ark. 2006). Bu nedenle DPPiV enziminin endokrin sistemini düzenleyici bir enzim olduğu düşünülmektedir.

DPPiV enzimi aynı zamanda CD26 (cluster of differentiation 26) olarak bilinmektedir. CD sistemi genel olarak hücrelerin yüzeylerindeki moleküllerin tanınması temeline dayanarak tutunmasına izin vermesi ile immunofenotiplemede hücre işaretleyicisi olarak kullanılmaktadır (Iwata ve Morimotoa 2007).

DPPiV enziminin eksikliği eklem iltihabını da içine alan pek çok otoimmün hastalığa sebep olabilmektedir (Sromova ve ark. 2010). Eklem yerlerinde bulunan kemokinler DPPiV enziminin substratlarından biridir. Kemokinler özellikle inflamasyon sahasına lökositlerin toplanması ve aktivasyonunda belirgin rol alan proteinlerdir (Baykal ve Akyol 2011). Kemokinlerin aşırı akümüasyonu sonucu eklem iltihapları görülmektedir. Yapılan çalışmalarda romatoid artrit, otoimmün kronik hepatit ve sistemik lupus eritamatozus gibi otoimmün hastalıklarda kemik eklem dokusu içindeki DPP IV düzeyi düşük bulunmuştur (Maes ve ark. 1996; Elgün ve ark 1999; Van West ve ark. 2000).

Yukarıda bahsedildiği gibi pek çok fizyolojik prosesin düzenlenmesinde görev alan DPPiV enzimi peptit dizilerini peptidin N-terminal ucundan başlayarak X-Pro bağımlı hidrolizleyerek parçalamaktadır (Marchetti ve ark. 1990; Sanz ve Toldra 2001; Kınık ve Görsoy 2002; Brudnak ve ark. 2005).

DPPiV enzimi tüm insan hücrelerinde, hayvan hücrelerinde ve çoğu mikrobiyal hücrede bulunmaktadır. Mikrobiyal kaynaklardan hücre-içi ve hücre-dışı elde edilmektedir. Hücre-dışı DPPiV üretimi gerçekleştiren mikrobiyal kaynaklar fungal; hücre-içi DPPiV üretimi yapanlar ise genellikle bakterilerdir. Laktik asit

bakterileri (LAB), hidrolaz grubu enzimler açısından çok çeşitli proteazlara sahiptir ve DPPIV enzimi de bunlardan biridir. Bu bakterilerin fungal kaynakların dezavantajı olarak görülen sekonder metabolit veya toksin üretimi gibi riskleri bulunmamakta ve genel olarak güvenilir olduğu kabul edilen GRAS (Generally Regarded as Safe) sınıfında yer almaktadır. Bunlara ek olarak, prokaryot bir bakterinin ikilenme süresinin fungal kaynaktan düşük olması, verimliliği arttırdığı için LAB tercih edilebilir (Üstün ve Öngen 2012). Bu çalışmada, 9 tane LAB içerisinde en yüksek DPPIV enzimi üreten mikroorganizma taraması yapılmış ve seçilen mikroorganizmadan elde edilen DPPIV'ün karakterizasyonu yapılmıştır. Enzim karakterizasyonu ile enzim ve substrat spesifikliği, enzim-inhibitör ilişkisi ve enzimin biyokimyasal özellikleri hakkında bilgi sahibi olunması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

1.1. Mikroorganizma taraması

Çalışmada kullanılan saf kültürler NRRL' den (United States Department of Agriculture Research, Education and Agricultural Research Service, ARS Culture Collection) temin edilmiştir. Tablo 1' de çalışmada kullanılan saf kültürler ve kültür koleksiyonu kodları verilmektedir. Bu mikroorganizmalar içerisinde en yüksek DPPIV enzimi üreten mikroorganizmayı bulmak için M-17 ve MRS ortamları kullanılmıştır (Simova ve ark. 2002; Perez Guzman ve ark. 2004).

1.2. DPPIV enziminin üretimden sonra saflaştırılması

En yüksek DPPIV aktivitesini veren mikroorganizma, ilgili ortamda üretildikten sonra 8000 g santrifüj hızında 15 dakika santrifüj edilmiştir. Ayrılan pellet 5 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) tamponu ile yıkanmış ve yeniden 8000 g santrifüj hızında 5 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra süpernanttan ayrılan hücreler yıkanmış ve ardından 0,1 M Tris-HCl tamponu içerisine süspanse edilmiştir. Ultrasonikasyon (Bandelin

Sonoplus HD2070, Berlin, Germany) ile 28 dakika, %91 W ve 3 döngüde sonike edilerek hücre parçalaması yapılmıştır (Üstün-Aytekın ve ark. 2016). Sırasıyla santrifüj (8000 g x 15 dak.), %70 amonyum sülfat çöktürmesi, santrifüj (20000 g x 30 dak.) diyaliz (Membracell 18X, 1000Da), Hiprep 16/10 Q FF Sepharose kolon (50mM Tris-HCl (pH7,5)'tir ve kolon içinde 0-1 M NaCl ile gradient) ve Hiprep 16/60 S300 HR Sephacryl kolon (50mM Tris-HCl (pH7,5)) uygulamaları ile yapılan DPPIV enzimi saflaştırılmıştır (Üstün ve Öngen 2012).

1.3. DPPIV enzim aktivitesi ölçümü

Enzim aktivite ölçümleri Sigma DPPIV enzim aktivitesi ölçüm prosedürüne göre yapılmıştır. Enzim aktivitesini belirlemek için öncelikle 0,1M Tris-HCl (pH 8,0) tamponu ile farklı konsantrasyonlarda p-Nitroaniline (pNA; 0,01-0,1 µmol/L) solüsyonu hazırlanmış ve 405 nm dalga boyunda standart eğri çizilmiştir. Enzim aktivitesi ölçümü için substrat olarak Gly-Pro-pNA kullanılmıştır. Mikroküvet içerisine 100 µL saflaştırılan DPPIV enzimi ve 100 µL 1mM substrat aktarılmıştır. Mikroküvet 37 °C' de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her küvete 100 µL asetik asit (1,5M) eklenerek reaksiyon durdurulmuş, spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüş ve enzim aktivitesi belirlenmiştir. Bir ünite enzim aktivitesi 1 µmol substratın 1 dakika içinde 1 µmol ürüne dönüşmesini sağlayan enzim birimi olarak hesaplanmıştır (Sigma procedure, 2006).

1.4. Protein miktarı ölçümü

Protein miktarını belirlemek için BCA (Bicinchoninic acid) kiti (Thermo, ABD) kullanılmıştır. Bu metotta bovine serum albümin (BSA) standart olarak kullanılmaktadır. Standart eğrisi çizilmiş (konsantrasyon aralığı 25-2000 µg/mL) ve standart eğri denklemi kullanılarak protein miktarları belirlenmiştir. Mikroküvet içerisine 25 µL saflaştırılan DPPIV enzimi ve 200 µL boya çözeltisi ilave edilmiş ve 37 °C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiş,

562 nm' de absorbanları ölçülmüş ve protein miktarı belirlenmiştir.

1.5. DPPIV enziminin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesi

Enzimin termal stabilitesini belirleyebilmek için enzim solüsyonları 15 dak. inkübasyon süresince

0 °C' den 50 °C' ye kadar farklı sıcaklıklara maruz bırakılmıştır ve örneklerin enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Enzimin pH aktivitesini belirlemek için ise pH 3,0'den 10,0'a kadar değişen aralıktaki pH değerlerine sahip solüsyonlar (50mM sodyum asetat, fosfat ve Tris-HCl) kullanılarak hazırlanan Gly-Pro-pNA substratı ile enzim solüsyonları 37 °C'de 15 dak. inkübe edilmiş ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür (Buckley ve ark. 2004). Ölçülen enzim aktiviteleri relatif aktivite olarak verilmiştir. Relatif aktivite formülü aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$\text{Relatif aktivite(\%)} = \frac{\text{İncelenen parametredeki enzim aktivitesi}}{\text{Optimum koşullardaki enzim aktivitesi}} \times 100$$

1.6. Enzim substrat spesifikliği

Enzim substrat spesifikliğini belirlemek için değişen substrat konsantrasyonuna göre reaksiyon hızının belirlenmesi gerekmektedir. DPPIV enziminin substrat spesifikliğini belirlemek için Gly-Pro-pNA ve Ala-Pro-pNA substratları kullanılmıştır. Kullanılan substratların konsantrasyonları 0,1 mM ile 1,4 mM arasında değişmiştir. Mikroküvet içerisine 100 µL saflaştırılan DPPIV enzimi ve belirlenen konsantrasyonda 100 µL substrat aktarılmıştır. 37 °C'de 15 dak. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her küvete 100 µL asetik asit (1,5M) eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve 405 nm'de enzim aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Michaelis-Menten kinetik modeli ve Lineweaver-Burk modelleri kullanılarak yorumlanmıştır. Enzim-substrat spesifikliği ve enzim-inhibitör ilişkisi çalışılırken kullanılan kinetik modeller V_{max} ve K_m değerleri

hesaplanarak değerlendirilmektedir. Sabit enzim konsantrasyonuna karşı substrat konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak ulaşılan maksimum hız noktası V_{max} adını almaktadır. K_m değeri ise maksimum hızın yarısına ($V_{max}/2$) karşılık gelen substrat derişimi (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilmektedir. V_0 reaksiyonun hızıdır.

Michaelis-Menten modeli;

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Lineweaver-Burk modeli;

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{S}\right) + \frac{1}{V_{max}}$$

1.7. Enzim inhibisyonu

Çevresel faktörlerin DPPIV enzimi üzerindeki etkilerini belirlemek için metal iyonlarının (Mg^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2}) klor tuzları, PMSF, EDTA ve jelatin inhibitör denemelerinde kullanılmıştır. İnhibitör denemeleri için Gly-Pro-p-nitroanilide substrat olarak seçilmiştir. Hazırlanan inhibitör maddelerin konsantrasyonu 1 mM'dır. 100 µL substrat, 100 µL inhibitör ve 100 µL saflaştırılan DPPIV enzim, tüp içerisine aktarılmış, 37 °C'de 15 dak. inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak 100 µL inhibitör yerine Tris-HCl tamponu eklenmiştir. İnkübasyon sonrasında her tüpe 100 µL asetik asit (1,5 M) eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve 405nm'de enzim aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk kinetik modelleri kullanılarak yorumlanmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

1.8. DPPIV enzim aktiviteleri

Çalışmamızda kullandığımız 9 tane LAB suşu, ilgili ortamlarda ve Tablo 1'de verilen koşullarda üretildikten sonra hücre parçalama işlemiyle hücre-içi DPPIV enzimi geri kazanılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Kültür koleksiyonundan temin edilen suşların DPPIV aktiviteleri
Table 1. DPPIV activities of strains obtained from the culture collection

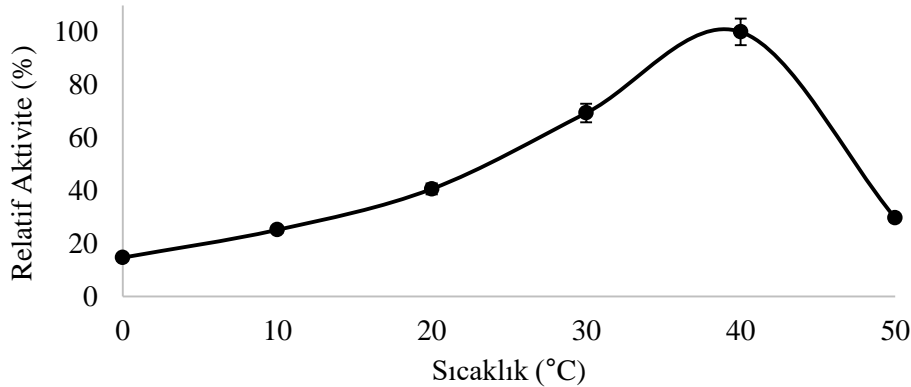
Bakteriler	Kültür numaraları	Üretim sıcaklığı (°C)	Besi ortamı	DPPIV aktiviteleri (mU/mL)
<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i>	NRRL-B-634	30	M-17 Broth	245±24,33
<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	NRRL-B-1821	30	M-17 Broth	268±21,22
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NRRL-B-23431	37	MRS Broth	31±2,08
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NRRL-B-1910	37	MRS Broth	27±2,88
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NRRL-B-4495	37	MRS Broth	63±5,04
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NRRL-B-4239	37	MRS Broth	59±10,81
<i>Lactobacillus helveticus</i>	NRRL-B-4526	37	MRS Broth	140±16,09
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	NRRL-B-2178	37	MRS Broth	31±4,61
<i>Lactobacillus gasserii</i>	NRRL-B-4240	37	MRS Broth	29±9,29

1.9. Enzim karakterizasyonu

3.2.2. Optimum çalışma sıcaklığın belirlenmesi

Lactococcus lactis spp. *lactis*'den saflaştırılan DPPIV enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için yapılan analizlerin sonucunda optimum sıcaklık değeri 40 °C olarak bulunmuştur (Şekil 1). *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* ve *Streptococcus gondoni* suşları ile

yapılan çalışmalarda optimum sıcaklık 45-50 °C olarak belirlenmiştir (Goldstein ve ark. 2001; Perez Guzman ve ark. 2006). *Lactobacillus helveticus* suşundan saflaştırılan DPPIV enzimi ile yapılan bir diğer çalışmada ise optimum sıcaklık 40°C olarak belirtilmiştir (Degraive ve Gros 2003). Optimum sıcaklıklar saflaştırılan enzimlerin kaynaklarının farklılığına göre değişiklik göstermektedir.



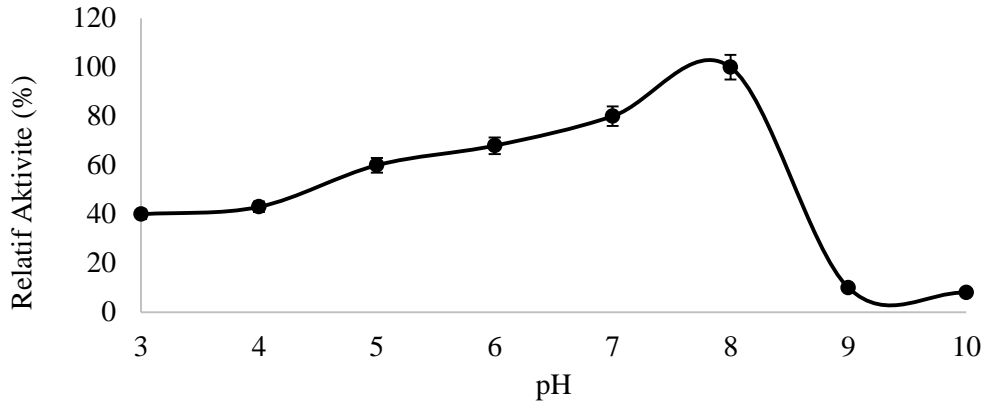
Şekil 1. *Lactococcus lactis* spp. *lactis*'den saflaştırılan DPPIV enzime sıcaklığın etkisi

Figure 1. Effect of temperature on DPPIV enzyme activity from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*.

Literatür verilerinin çalışmamızda aldığımız sonuçlara yakın ve/veya benzer olduğu görülmüştür. Optimum sıcaklığın vücut sıcaklığına oldukça yakın bulunması enzimin gıda takviyesi olarak kullanımı fikrini güçlendirmektedir.

3.2.3. Optimum çalışma pH değerinin belirlenmesi

Lactococcus lactis spp. *lactis*'den elde edilen ve saflaştırılan DPPIV enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi için yapılan analizlerin sonucunda optimum pH değerinin 8,0 olduğu belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. *Lactococcus lactis* spp. *lactis*'den saflaştırılan DPPIV enzim aktivitesine pH etkisi

Figure 2. Effect of pH on DPPIV enzyme activity from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*.

Lactococcus lactis spp. *cremoris* ve *Lactobacillus helveticus* ile yapılan çalışmalarda optimum pH 7,0; *Lactobacillus sakei* ile yapılan çalışmada ise optimum pH 7,5 olarak belirtilmiştir (Sanz ve Toldra 2001; Degraive ve Gros 2003; Perez Guzman ve ark. 2006). *Porphyromonas gingivalis* suşu ile yapılan çalışmada optimum pH aralığı 6,5-8,0 olarak belirlenmiştir (Banbula 2000). Literatür verileri incelendiğinde genel olarak elde edilen DPPIV nötral pH değerlerinde en yüksek aktivitesini vermiştir. Bu veriler çalışmamızda aldığımız sonuçlara yakın ve/veya benzer bulunmuştur. Enzimin nötral pH değerlerinde yüksek aktivite göstermesi bazik olan ve protein sindirimini gerçekleştirdiği bağırsak ortamında en yüksek kapasite ile çalışacağını göstermektedir. Gıda takviyesi olarak kullanım olanağı bulunan bu enzimin enkapsüle tablet formuna getirildikten sonra *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen enzim salınım kontrolleri de bu sonucu desteklemekte ve yüksek oranda enzim salınımı gerçekleştirmektedir (Çetin ve ark. 2007).

3.2.4. Enzim-substrat spesifikliğı

Bir enzimin K_m değeri ne kadar düşük ise substrata afinitesi o kadar yüksektir. Enzimin substrat spesifikliğı belirlenirken pNA ile işaretlenmiş sentetik Gly-Pro-pNA ve Ala-Pro-pNA substratları kullanılmış ve Gly-Pro-pNA peptid dizisine ait K_m değeri 0,57 mM ve V_{max} değeri 0,017 mM min^{-1} bulunmuştur. Ala-Pro-

pNA substratına ait K_m değeri 2,90 mM ve V_{max} değeri 0,018 mM min^{-1} olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar dikkate alındığında çalışmamızda saflaştırılan DPPIV enziminin Gly-Pro-pNA substratına afinitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Benzer şekilde Tson ve Yan (1992) tarafından yapılan ve *Lactococcus cremoris*'den saflaştırılan DPPIV enziminin Gly-Pro-pNA substratına Ala-Pro-pNA substratından daha ilgili olduğu görülmüştür. *Lactobacillus sakei* ve *Lactobacillus helveticus* kaynaklı DPPIV enzimi için yapılan spesifik substrat çalışmalarında enzimin Ala-Pro-pNA substratına ilgisinin Gly-Pro-pNA substratına ilgisinden daha yüksek olduğu bulunmuştur (Sanz ve Toldra 2001; Degraive ve Gros 2003). *Lactococcus lactis* ve *Lactococcus cremoris* suşlarından elde edilen DPPIV enziminin spesifik substratı Arg-Pro-pNA olarak belirtilmiştir (Zevaco ve ark. 1990; Perez Guzman 2004). *Streptococcus suis* bakterisinden elde edilen dört farklı proteazın karakterize edildiği bir çalışmada DPPIV enziminin sentetik Gly-Pro-pNA substratına ilgisinin yüksek olduğu bildirilmiş (Jobin ve ark. 2003) ve araştırmacılar bu bulgudan sonra ilgili DPPIV enzimi *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisine aktarıp ekspresyonunu yaparak DPPIV enziminin sentetik Gly-Pro-pNA substratına (K_m : 0,26 mM) %100 relatif aktivite ile yüksek afinite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ala-Pro-pNA substratı %80 relatif aktivite ve 12mM K_m değeri ile Gly-Pro-pNA substratını takip etmiştir (Jobin ve ark. 2005).

3.2.5. Enzim inhibisyonları

DPPIV enziminin kompleks ortamlardaki, gıda ya da metabolizma gibi, davranışını karakterize etmek için farklı divalent katyonlar, serin proteazlar üzerinde inhibitör etkisi olduğu bilinen PMSF, metal iyonlarına bağlanarak inhibitör etki

gösteren EDTA, bu maddelerle birlikte saflaştırılan enzimin gıda takviyesi olarak üretilebileceği düşünüldüğünden kaplama materyali olarak kullanılabilir olan jelatinin enzim üzerindeki inhibitör etkileri belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. İnhibitörlere ait V_{max} , K_m , inhibisyon türü ve relatif aktivite değerleri

Table 2. V_{max} , K_m , inhibition type and relative activity values of inhibitors

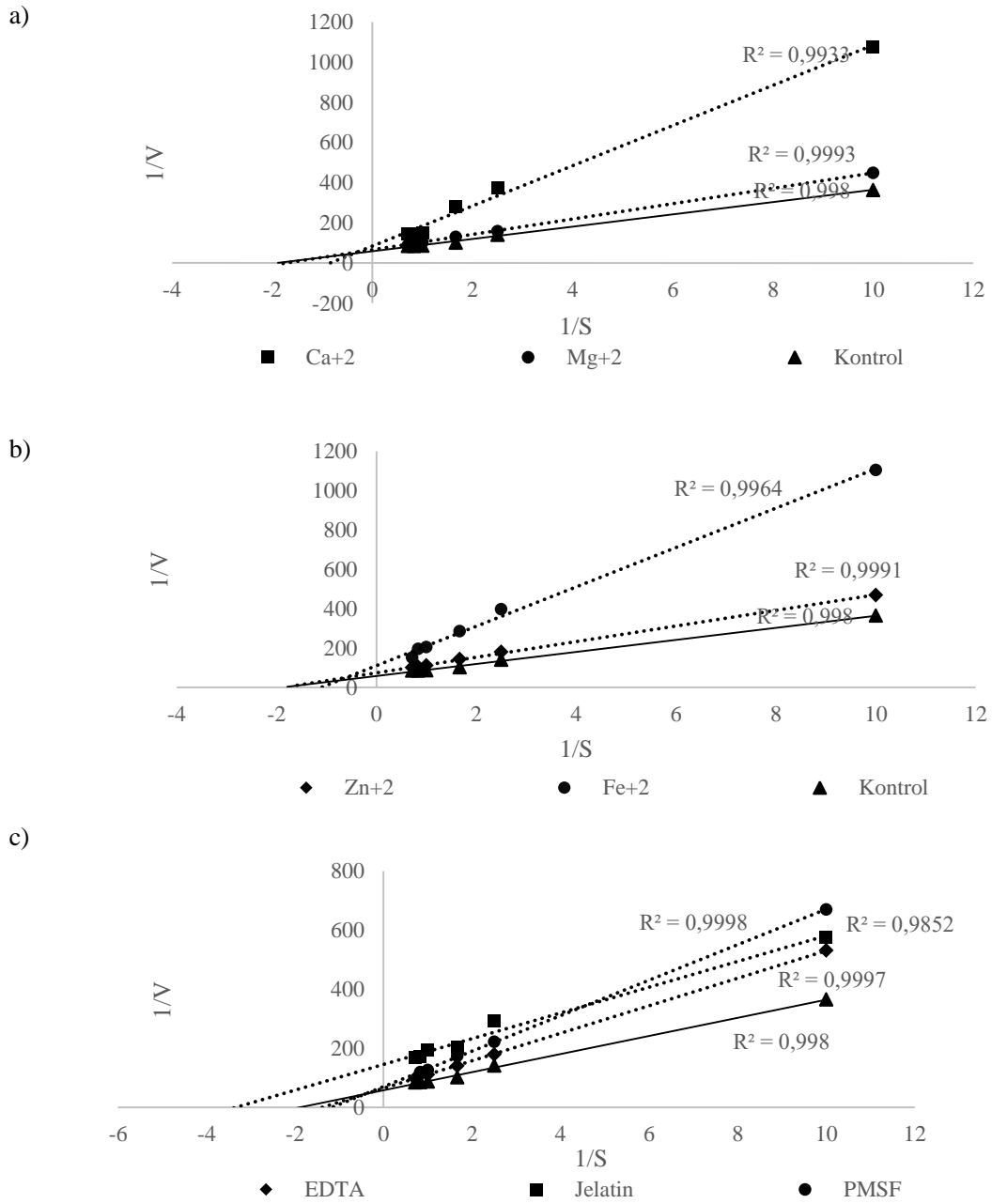
İnhibitör	V_{max} (mM/min)	K_m (mM)	İnhibisyon Türü	Relatif Aktivite (%)
Ca ⁺²	0,012	1,18	Yarışmalı	58,89
Hg ⁺²	0,008	0,87	Yarışmalı	52,36
Fe ⁺²	0,014	0,53	Yarışmasız (noncompetitive)	85,81
Zn ⁺²	0,009	0,90	Yarışmalı	56,57
Mg ⁺²	0,015	0,58	Yarışmasız (noncompetitive)	96,74
EDTA	0,150	0,71	Yarışmalı	88,12
PMSF	0,012	0,79	Yarışmalı	60,34
Jelatin	0,007	0,29	Yarışmayan (yarışmayan)	51,72

*Kontrol grubunun V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 0,017 ve 0,57 olarak hesaplanmıştır.

Yapılan analizlerde belirlenen K_m , V_{max} , inhibisyon türü ve relatif aktivite sonuçları Tablo 2'de belirtilmiştir. Metal iyonları arasında en yüksek inhibisyon etkisini gösteren iyonların sırası ile Hg⁺² > Zn⁺² > Ca⁺² olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki en yüksek inhibisyon etki gösteren Hg⁺² enzimin sülfidril gruplarına güçlü afinite göstermektedir. Benzer bir sonuç *Lactobacillus sakei* kaynaklı DPPIV enziminin kullanıldığı bir çalışmada elde edilmiştir. Bu çalışmada enzim üzerine en yüksek inhibitör etkiyi sırasıyla Hg⁺²>Cu⁺²>Mg⁺² iyonlarının gösterdiği belirlenmiştir (Sanz ve Toldra 2001). *Lactobacillus helveticus* suşundan elde edilen DPPIV enzime ait inhibisyon sonuçlarına göre 1 mM konsantrasyonda Ca⁺² ve Mg⁺² iyonlarının enzimi birbirlerine yakın değerlerde inhibe ettiği belirtilmiştir (Degraeve ve Gros 2003). *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046 suşundan elde edilen DPPIV enziminin rekombinasyonu sonrasında metal iyonlarının inhibisyon etkisinin sırası ile Co⁺² > Zn⁺² > Mn⁺² > Ca⁺² > Mg⁺² olarak

tespit edildiğini bildirmiştir (Stressler ve ark. 2013). Sonuçları Zn⁺² ve Ca⁺² iyonlarının enzime olan ilgisi ve Mg⁺² iyonunun afinitesinin düşük olması açısından bu çalışma ile tutarlılık göstermektedir. Mg⁺² yanı sıra Fe⁺² iyonu da DPPIV enzimi için katalitik etki göstermiştir.

LAB'lerinden elde edilen DPPIV enzimlerinin serin peptidaz olduğu bilinmektedir. Saflaştırdığımız enzime aktif bölgesindeki serin amino asitini bloke ederek inhibitör etki gösteren phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 1mM) ilave edildiğinde enzimin relatif aktivitesi %60,34'e düşmüştür. Aynı konsantrasyonda *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046 suşundan elde edilen DPPIV enzime ilave edilen PMSF inhibitörü enzimin relatif aktivitesini %66'ya düşürmüştür (Stressler ve ark. 2013). Sonuçlar DPPIV enziminin aktif bölgesinde serin amino asidi olduğunu ve PMSF inhibitörünün DPPIV enzimi için iyi karakterize edilmiş bir yarışmalı inhibitör olduğunu göstermektedir.



Şekil 3: Toprak alkali (a) ve geçiş metalleri (b) ile diğer (c) inhibitörlere ait Lineweaver-Burk grafikleri
Figure 3: Lineweaver-Burk plots of inhibited enzymes with alkaline earth metals (a), transition metals (b) and other inhibitors (c).

Enzimin aktif bölgesinde bulunan metal iyonuna bağlanarak inhibitör etkiye sebep olan EDTA'nın saflaştırılan enzim üzerinde inhibitör etki göstermediği görülmüştür. Enzimin aktif bölgesinde metal iyonu bulunması enzimin metaloprotein olduğunu göstermektedir (Jobin ve ark. 2003; Janecki ve Reilly 2005). *Lactococcus*

lactis spp. *cremoris* suşunun kullanıldığı EDTA ve PMSF ile yapılan bir çalışmadan alınan sonuçlara bakıldığında PMSF'in inhibitör etki gösterdiği ancak EDTA'nın inhibitör etki göstermediği görülmüştür (Perez Guzman ve ark. 2006). Prolin aminoasidi içeren tripeptitler DPPIV enzimi üzerinde inhibe edici etki yapmaktadır

(Jobin ve ark. 2003). Bunun en önemli kanıtı Diprotin A (Isoleucine-Proline-Isoleucine) ile verdiği enzimatik reaksiyondur. DPPIV enziminin peptidik inhibitörü Diprotin A (1mM) saflaştırılan enzim ile reaksiyona girdiğinde enzimi büyük ölçüde inhibe etmiştir (relatif aktivite %4,31). Yapılan çalışmalar bulgularımızı desteklemektedir.

Çalışmada bunlardan farklı olarak başka bir önemli bulgu ise gıda takviyesi olarak kullanılması planlanan saflaştırılmış DPPIV enzimini tablet formuna getirmek ve enkapsüle etmek için kullanılan materyallerden biri olan jelatinin inhibitör etkilerinin tespiti olmuştur. Jelatin (10 mg/ml) saflaştırılmış DPPIV enziminin relatif aktivitesini %51,72'ye düşürmüştür. Jelatinin protein yapısından dolayı parçalanma işlemi bağırsakta sonlandırılır ve bu işlem sırasında da enkapsüle olan DPPIV yavaşıca salınım yaparak aktivite gösterir. Bu yüzden jelatinle yapılacak olan bir enkapsülasyon işleminde DPPIV aktivitesi %51,72'den kesinlikle büyük olacaktır.

4. Sonuçlar

Substrat spesifliğinin, metal iyonlarının, farklı proteaz inhibitörlerinin ve EDTA'nın saflaştırdığımız enzimle verdiği enzimatik reaksiyonlar değerlendirildiğinde saflaştırdığımız enzimin Gly-Pro-pNA substratına ilgisinin yüksek olduğu, ağır metallerle güçlü afinite gösterdiği için en yüksek inhibisyonunu Hg^{+2} ile verdiği, PMSF'ye verdiği biyokimyasal cevap değerlendirildiğinde aktif bölgesinde serin amino asiti içerdiği ve bir serin aminopeptidaz olduğu, başka bir proteaz inhibitörü olan EDTA'ya inhibitör etki göstermediği için bu enzimin bir metalloenzim olmadığı sonucuna varılmıştır. Saflaştırılan DPPIV enziminin ticari ürün olarak kullanımı söz konusu olduğunda enkapsüle edilmesi gündeme gelmektedir. Enkapsülasyon kaplama materyali olarak düşünülen ve inhibitör etkisi incelenen jelatinin, DPPIV enzimine inhibitör etkisi olduğu ve aktivite değerlerini yarıya yakın oranda düşürdüğü görülmüştür. Ticarileştirilmek istenir ise farklı enkapsülasyon materyallerinin enzime etkisi incelenebilir. Sonuç

olarak saflaştırılan mikrobiyal kaynaklı DPPIV enziminin vücut sıcaklığında ve bağırsak gibi bazik bir ortamda (Ph 8.5) optimum aktivitesini göstermesi bu enzimin ticari ürün olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

Kaynaklar

- Banbula A, Bugno M, Goldstein J, Yen J, Nelson D, Travis J, Potempa J (2000). Emerging family of proline-specific peptidases of *Porphyromonas gingivalis*: purification and characterization of serine dipeptidyl peptidase, a structural and functional homologue of mammalian prolyl dipeptidyl peptidase IV. *Infection and immunity*, 68(3): 1176-1182.
- Baykal Y, Akyol T, 'Romatoid Artritte Yeni Tedavi Yaklaşımları' <http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/ichastaliklari/files/kitaplar/137.pdf> (Erişim Tarihi 29 Mayıs 2011)
- Brandt I, Lambeir AM, Maes MB, Scharpé S, Meester ID (2006). Peptidesubstrates of dipeptidyl peptidases, dipeptidyl aminopeptidases. basic science and clinical applications, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 575 (18): 3-18.
- Brudnak M, Buchholz I, Hoener S, Newman L, Pangborn J (2005). Guide to intestinal health in autism spectrum disorder, a comprehensive review of intestinal health issues in autism spectrum disorders and the options available for treating them, authored by Kirkman labs" Technical Staff, 1-175.
- Buckley SJ, Collins PJ, O'Connor BF (2004). The purification and characterisation of novel dipeptidyl peptidase IV-like activity from bovine serum. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(7): 1281-1296.
- Çetin EM, Üstün Ö, Kırılmaz L, Öngen G (2007). The application of hydroxypropylmethylcellulose phtalate capsules: an alternative administration route of dipeptidyl peptidase enzyme. *Pharmaceutical Sciences World Congress*, 22-25 April 2007, 63. Amsterdam.
- Degraeve P and Martial-Gros A (2003). Purification and partial characterisation of x-prolyl dipeptidyl aminopeptidase of *Lactobacillus helveticus* ITG LH1. *International journal of Dairy Technology*, 13(7): 497-507.
- Elgün S, Keskiner A, Kumbasar H, (1999). Dipeptidyl peptidase IV and adenosine deaminase activity, decrease in depression, *Psychoneuroendocrinology*, 24:823-832.
- Goldstein JM, Banbula A, Kordula T, Mayo JA, Travis J (2001). Novel extracellular x-prolyl dipeptidyl-peptidase (DPP) from *Streptococcus gordonii* FSS2: an emerging subfamily of viridans streptococcal x-prolyl dpps, *Infection and Immunity*, 69(9): 5494-5501.
- Iwata S and Morimoto CB (2007). CD26/Dipeptidyl Peptidase IV in Context, The Different Roles Of A Multifunctional Ectoenzyme in Malignant Transformation, Division Of Tumor Immunology, Dana-Farber Cancer Institute and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Ma 02115.

- Janecki DJ and Reilly JP (2005). Denaturation of metalloproteins with EDTA to facilitate enzymatic digestion and mass fingerprinting, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(10): 1268-1272.
- Jobin MC, and Grenier D (2003). Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiology Letters*, 220(1): 113-119.
- Jobin MC, Martinez G, Motard J, Gottschalk M, Grenier D (2005). Cloning, purification, and enzymatic properties of dipeptidyl peptidase IV from the swine pathogen *Streptococcus suis*. *Journal of Bacteriology*, 187(2): 795-799.
- Kınık Ö ve Gürsoy O (2002). Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptitler. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 8(2): 195- 203.
- Maes M, Meester I, Scharpe S, Desnder R, Ranjan R, Meltzer Hy (1996). Alterations in plasma dipeptidyl peptidase iv enzyme activity in depression and schizophrenia: effects of antidepressants and antipsychotic drugs, *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 93:1-8.
- Marchetti B, Scifo R, Batticane N, Scapagnini U (1990). Immunological significance of opioid peptide dysfunction in infantile autism, *Brain Dysfunction*, 3: 346-354.
- Noni I, FitzGerald RJ, Korhonen HJT, Roux Y, Livesey CT, Thorsdottir I, Tomé D, Witkamp R (2009). Review of The Potential Health Impact of β -Casomorphins and Related Peptides. *EFSA Scientific Report*, 231: 1-107.
- Perez Guzman EA, Victoria TC, Cruz-Camarillo R, Hernandez-Sanchez H (2004). Improvement of fermentation conditions for the production of x-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 413-417.
- Perez Guzman EA, Victoria TC, Cruz-Camarillo R, Hernandez-Sanchez H (2006). Purification and characterization of x-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NRRL 634, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9): 953-958.
- Pihlanto-Leppälä A (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides, *Trends in Food Science and Technology*, 11: 347-356.
- Saatci E, Erarslan A, Dinç H, İşcan A (2011). Sütteki şeytan: hastalıkta ve sağlıkta A1 ve A2 süt. 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, 29 Kasım-2 Aralık 2011, s.36. Adana.
- Sanz Y and Toldra F (2001). Purification and characterization of an x-prolyl-dipeptidyl peptidase from *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:1815-1820.
- Sentandreu MA, Toldra F (2001). "Dipeptidyl Peptidase IV from Porcine Skeletal Muscle: Purification and Biochemical Properties", *Food Chem*, 75, 2, 159–168.
- Sigma (2006) In: Quality control procedure, quality control procedure enzymatic assay of dipeptidyl peptidase IV (EC 3.4.14.5), pp 1–2, Germany.
- Simova E, Beshkova D, Angelov A, Hristozova T, Frengova G, Spazov Z (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28 :1-6.
- Sromova L, Mareckova H, Sedova L, Balaziová E, Sedo A (2010). Dipeptidyl peptidase-IV in synovial fluid and in synovial fluid mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis, *Clinica Chimica Acta*, 111:1046-1050.
- Stressler T, Eisele T, Schlayer M, Lutz-Wahl S, Fischer L (2013). Characterization of the recombinant exopeptidases PepX and PepN from *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046 important for food protein hydrolysis, *PLoS one*, 8(7): e70055.
- Üstün-Aytekın Ö, Arısoy S, Aytekin AÖ, Yıldız E (2016). Statistical optimization of cell disruption techniques for releasing intracellular X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* spp. *Lactis*, *Ultrasonics Sonochemistry*, 29: 163-171.
- Üstün Ö ve Öngen G (2012). Production and separation of dipeptidyl peptidase IV from *Lactococcus lactis*: Scale up for industrial production, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35 (8):1417-1427.
- Van WD, Monteleone P, Di LA, Meester I, Durinx C, Scharpe S (2000). Lowered serum dipeptidyl peptidase iv activity in patients with anorexia and bulimia nervosa, *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 250: 86-92.
- Yan TR, Ho SC, Hou CL (1992). Catalytic properties of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* nTR, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(5): 704-707.
- Zevaco C, Monnet V, Gripon JC (1990). Intracellular X-prolyl dipeptidyl peptidase from *Lactococcus lactis* Spp. *Lactis*: purification and properties, *Journal of Applied Microbiology*, 68 (4): 357–366.