

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YEREL İZOLAT *Bacillus* sp. GYTE-L1
ALKALEN PROTEAZININ
SAFLAŞTIRILMASI VE NİTELENDİRİLMESİ

Alper ALDENİZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2005

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YEREL İZOLAT *Bacillus* sp. GYTE-L1
ALKALEN PROTEAZININ
SAFLAŞTIRILMASI VE NİTELENDİRİLMESİ

Alper ALDENİZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Füsun GÜMÜŞEL

GEBZE
2005

ÖZET

Proteazlar, proteinlerin peptit bağlarının hidrolizini katalize eden hidrolitik enzimlerdir. Serin proteazların (E.C. 3.4.21) alt tipi olan alkalen proteazlar deri, gıda, deterjan, eczacılık, fotoğraf, atık yönetimi gibi birçok endüstriyel alanda kullanılan bir enzim grubudur. Son yıllarda endüstride klasik yöntemler yerine enzimlere dayalı süreçlerin kullanımı giderek ağırlık kazanmaktadır. Enzimlerin kullanıldığı endüstriyel işlemler daha ucuz ve kaliteli ürün eldesine olanak sağlamaktadır. Alkalen proteazlar geniş pH ve sıcaklık aralıklarında kararlı olduklarından birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Alkalen proteazlar çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilseler de, endüstriyel alanlarda kullanılacak enzimlerin kaynağı olarak *Bacillus* türleri tercih edilmektedir. GYTE, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Enzim Moleküler Genetiği Laboratuvarında yürütülen bu tez çalışmasında *Bacillus* sp. GYTE-L1 alkalen proteaz enziminin üretilmesi, saflaştırılması ve nitelendirilmesi amaçlanmıştır.

Bacillus sp. GYTE-L1 alkalen proteazı, amonyum sülfat çöktürmesi, Q-sefaroze anyon değişim kromatografisi ve Sefakril S 100 kolon kromatografisinin kullanıldığı süreç sonunda yaklaşık olarak 105 kez saflaştırılmıştır. *Bacillus* sp. GYTE-L1 alkalen proteazını nitelendirme çalışmaları kapsamında, optimum sıcaklık değeri 50–55 °C bulunmuştur. Ayrıca 45–55 °C aralığında enzim aktivitesinin % 50’den fazlasının korunduğu görülmüştür. 10 mM CaCl₂’ün enzimin sıcaklık kararlılığını 50 ve 60 °C’te çok etkin şekilde arttırdığı saptanmıştır. Enzimin optimum pH değeri 9.0 ve kararlılık gösterdiği pH aralığı 7–11 bulunmuştur. Enzim aktivitesinin, Ca²⁺, Na⁺, Cu²⁺, Ba²⁺ ve Ni²⁺ iyonlarının varlığında arttığı, K⁺ ve Zn²⁺ iyonları ile inhibe olduğu gözlenmiştir.

Denenen deterjanlardan SDS ve deoksikolatın enzimin başlangıçtaki aktivitesini kuvvetle indirgemesine karşın, Tween 20, Triton X-100 ve CTAB’ın değişen miktarlarda arttırdığı görülmüştür. EDTA ve PMSF’in enzimi inhibe ettiği, buna karşın DTT’nin enzim kararlılığını arttırdığı saptanmıştır. Enzim kararlılığının başta DMSO, aseton ve izoamilalkol olmak üzere çeşitli organik çözücüler içinde korunduğu ve iyileştiği belirlenmiştir. Enzimin optimal pH/sıcaklık değerlerine ek

olarak, pH, 7.0-11.0 aralığında kararlı olması ve özellikle Ca^{2+} , DMSO ve gliserol varlığında iyileşen sıcaklık kararlılığı; GYTE L-1 proteazını çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için çekici bir aday kılmaktadır.

SUMMARY

Proteases are the enzymes which catalyze the hydrolysis of the peptide bonds within proteins. Alkaline proteases, which are the subgroup of serine proteases, are used in a variety of industrial processes including leather, food, detergent, pharmaceuticals and waste management. Recently, use of enzymes in industry instead of traditional methods gains more importance. Enzymes using in industrial processes increases the quality of the products, while decreasing the production cost. Due to their high pH and temperature stabilities, alkaline proteases have been widely used in various industrial processes. Although alkaline proteases are produced by several organisms, the members of *Bacillus* genus are preferred as the enzyme sources for industrial applications. In this thesis work, performed in the Enzyme Molecular Genetics Laboratory, Molecular Biology Department (GIT), production, purification and characterization of the alkaline protease from *Bacillus* sp. GYTE-L1 have been aimed.

Alkaline protease from *Bacillus* sp. GYTE-L1 was purified 105 times by using ammonium sulphate precipitation, Q-sepharose anion exchange chromatography and Sephacryl S100 gel filtration chromatography. In the context of characterization studies, optimum temperature of the enzyme was found as 50–55 °C and the enzyme showed 50 % residual activity in the range of 45-50 °C. 10 mM CaCl₂ effectively increased the enzyme stability at 50 and 60 °C. The optimal pH was found as 9.0 and the enzyme was stable in the pH range of 7.0–11.0. Enzyme activity increased in the presence of metal ions Ca²⁺, Na⁺, Cu⁺², Ba⁺² and Ni⁺ and decreased in the presence of Zn⁺², K⁺.

While SDS and deoxycholate strongly reduced starting activity of the enzyme, the presence of detergents Tween-20, Triton X-100 and CTAB has resulted in a rise in the enzyme activity in varying degrees. Enzyme stability was sustained and improved in DMSO, acetone and isoamyl alcohol. The GYTE-L1 protease is an attractive candidate for several biotechnological applications due to its stability within pH range of 7-11 and improved stability in the presence of Ca²⁺, DMSO and glycerol, in addition to its pH and temperature optimals.

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez konusunun önerilmesinden başlayarak tez kapsamındaki tüm çalışmalarımı yönlendiren, kıymetli fikirleri ile bana yol gösteren, çalışmalarımı gerçekleştirebileceğim olanakları sağlayan ve tez raporunun hazırlanmasında büyük destek veren değerli hocam Prof. Dr. Füsün GÜMÜŞEL'e ve laboratuvar çalışmalarım boyunca sabır, emek, güler yüz ve bilgisini esirgemeksizin bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarını yürütmemde büyük pay sahibi olan ve bana gerçek dostluğun anlamını bir kere daha öğreten, Ar.Gör. Mutlu BATTAL, Ar.Gör. Nagihan AKBULUT ve Ar.Gör. Merve TUZLAĞOĞLU ÖZTÜRK'e, sevgili arkadaşım Abdullah SARRAÇ'a ve yine laboratuvarda çalıştığım sürece gösterdiği dostluk için Yrd. Doç. Dr. Yosun MATER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca ve bu üst çalışmayı gerçekleştirmek üzere bana maddi ve manevi anlamda destek olan sevgili Anneme, Babama ve ayrıca kardeşlerime şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGE VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Proteazlar	1
1.2. Proteaz Kaynakları	1
1.3. Sınıflandırma ve Adlandırma	2
1.3.1. Ekzopeptidazlar	3
1.3.2. Endopeptidazlar	3
1.3.2.1. Serin Proteazlar	4
1.3.2.2. Sistein Proteazlar	4
1.3.2.3. Aspartat Proteazlar	4
1.3.2.4. Metalloproteazlar	4
1.4. Proteazların Katalitik Mekanizmaları	5
1.4.1. Serin Endopeptidazların Katalitik Mekanizması	5
1.4.2. Sistein Endopeptidazların Katalitik Mekanizması	6
1.4.3. Aspartat Endopeptidazların Katalitik Mekanizması	7
1.4.4. Metallo-endopeptidazların Katalitik Mekanizması	8
1.5. Endüstriyel Açıdan Alkalen Proteazlar	9
1.5.1. Mandıra Endüstrisinde Alkalen Proteazlar	12
1.5.2. Atıkların Yok Edilmesi ve Dönüşümü	12
1.5.3. Deri Endüstrisinde Proteazlar	13
1.5.4. Deterjan Endüstrisinde Alkalen Proteazlar	13
1.6. Saflaştırma Teknikleri	14
1.6.1. Çöktürme	15
1.6.2. Kromatografik Yöntemler	16
1.6.3. Kolon Kromatografisi	16

1.6.3.1. Jel Filtrasyon	17
1.6.3.2. İyon Değişim Kromatografisi	17
1.6.4.3. Afinite Kromatografisi	18
1.7. Tezin Amacı	19
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
2.1. Gereçler	20
2.1.1. Kullanılan Sarf Malzemesi	20
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	22
2.2. Yöntemler	23
2.2.1. Enzim Kaynağının Seçilmesi	23
2.2.2. Hücre Kültürünün Hazırlanması	25
2.2.3. Kültür Üst Sıvısının Toplanması	26
2.2.4. <i>Bacillus</i> sp. GYTE-L1 Alkalen Proteazının Saflaştırılması	26
2.2.4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	26
2.2.4.2. Kromatografi	26
2.2.4.3. Kromatografi Rezinleri ve Kolonların Hazırlanması	27
2.2.4.4. Kromatografi Çalışmaları	27
2.2.5. Alkalen Proteaz Aktivite Testi	28
2.2.6. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	29
2.2.7. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE), Nativ PAGE ve Zimogram Analizi	30
2.2.8. Protein Miktarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi	33
2.3. Alkalen Proteazın Nitelendirilmesi	34
2.3.1. Optimum Reaksiyon Sıcaklığının ve Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi	35
2.3.2. Optimum Reaksiyon pH'sının ve pH Kararlılığının Belirlenmesi	35
2.3.3. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi	36
2.3.4. Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	36
2.3.5. Çeşitli Organik Çözücülerin Enzim Aktivitesine Etkisi	36
2.3.6. Bazı İnhibitörler ve Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	37
2.3.7. Çeşitli Maddelerin Enzim Aktivitesi ve Sıcaklık Kararlılığı Üzerine Etkisi	37

3. BULGULAR	38
3.1. Yerel İzolat <i>Bacillus</i> sp. GYTE-L1 Alkalen Proteazının Üretilmesi ve Saflaştırılması	38
3.1.1. <i>Bacillus</i> sp. GYTE-L1 Alkalen Proteazının Üretilmesi	38
3.1.2. <i>Bacillus</i> sp. GYTE-L1 Alkalen Proteazının Kültür Üst Sıvısından Saflaştırılması	39
3.1.2.1. Q-Sefaroz İyon Değişim Kromatografisi	42
3.1.2.2. Sefakril S-100 Jel Filtrasyon Kromatografisi	43
3.2. <i>Bacillus</i> sp. GYTE-L1 Alkalen Proteazının Nitelendirilmesi	44
3.2.1. Optimum Reaksiyon Sıcaklığı ve Sıcaklık Kararlılığı	44
3.2.2. Optimum Reaksiyon pH'sı ve pH Kararlılığı	45
3.2.3. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi	46
3.2.4. Deterjanların Enzim Aktivitesine Etkisi	48
3.2.5. Çeşitli Organik Çözücülerin Enzim Aktivitesine Etkisi	51
3.2.6. Bazı İnhibitörler ve Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	53
3.2.7. Çeşitli Maddelerin Enzim Aktivitesi/Sıcaklık Kararlılığı Üzerine Etkisi	55
3.3. Zimogram Analizi Sonuçları	63
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
4.1. Sonuçlar	84
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	89

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
°C	Derece Santigrat
ml	Mililitre
U	Ünite
LB	Luria Broth
M	Molar
mM	Milimolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Serin endopeptidazların katalitik mekanizması	6
1.2. Sistein endopeptidazların katalitik mekanizması	7
1.3. Aspartat endopeptidazların katalitik mekanizması	8
1.4. Metallo-endopeptidazların katalitik mekanizması	9
3.1. <i>Bacillus</i> sp. GYTE-L1'in enzim aktivitesi ve büyüme eğrisi	39
3.2. Q-sefaroze iyon değişim kromatografisi fraksiyonları A ₂₈₀ ve enzim aktivitesi grafiği	41
3.3. Q-sefaroze fraksiyonlarının SDS-PAGE profili	41
3.4. Sefakril S100 kromatografisi fraksiyonları A ₂₈₀ ve enzim aktivitesi grafiği	42
3.5. Sefakril S100 fraksiyonlarının SDS-PAGE profili	43
3.6. <i>Bacillus</i> sp. GYTE-L1 alkalin proteazının optimal reaksiyon sıcaklığı ve sıcaklık kararlılığı grafiği	44
3.7. <i>Bacillus</i> sp. GYTE-L1 alkalin proteazının optimal pH grafiği	45
3.8. <i>Bacillus</i> sp. GYTE-L1 alkalin proteazının pH kararlılık grafiği	46
3.9. Çeşitli metal iyonların alkalin proteaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.	47
3.10. Çeşitli deterjanların enzim aktivitesi üzerine etkisi	50
3.11. Çeşitli organik çözücülerin enzim aktivitesine etkileri	52
3.12. Bazı inhibitörler ve kimyasalların enzim aktivitesine etkisi	54
3.13. Çeşitli maddelerin enzimin sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi	57
3.14. CaCl ₂ 'ün 60 °C'ta enzimin sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi	58
3.15. 10 mM CaCl ₂ ve 5 mM EDTA varlığında 50°C'ta enzim kararlılığı	60
3.16. 10 mM CaCl ₂ +5 mM EDTA varlığında 50°C'ta enzim enzim kararlılığı	62
3.17. <i>Bacillus</i> sp. GYTE-L1 alkalin proteazı SDS-PAGE ve zimogram analizi	63

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bakteriyel Alkalen Proteazlar, Kaynakları, Endüstriyel Uygulama Alanları ve Üreticileri	11
2.1. Kalibrasyon eğrisi için L-tirozin dilüsyonlarının hazırlanması	29
2.2. Bradford kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve toplam protein miktarının hesaplanması	34
3.1. <i>Bacillus</i> sp. GYTE-L1 alkalen protezını saflaştırma tablosu	43
3.2. Çeşitli metal iyonların alkalen proteaz aktivitesi üzerine etkisi	47
3.3. Çeşitli deterjanların enzim aktivitesine etkisi	49
3.4. Çeşitli organik çözücülerin enzim aktivitesine etkileri	51
3.5. Bazı inhibitörler ve kimyasalların enzim aktivitesine etkileri	53
3.6. Çeşitli maddelerin enzimin sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi	56
3.7. 10 mM CaCl ₂ ve 5mM EDTA varlığında enzim aktivitesi	59
3.8. 60°C'ta 10 mM CaCl ₂ ve 5 mM EDTA varlığında enzim kararlılığı	61

1. GİRİŞ

1.1. Proteazlar

Enzimler birçok kimyasal reaksiyonda iş gören ve ticari olarak deterjan, gıda, ilaç sanayi, fırıncılık, yakıt, hayvan yemi imalatı, meşrubat, tekstil, kağıt, tanı ve kimya endüstrilerinde kullanılan biyokatalistlerdir. Tanımlanmış olan 3000 den fazla enzimin çoğunluğu mezofilik organizmalardan izole edilmiştir (Rao ve ark., 1998; Kumar ve ark.,1999; Kirk ve ark.). Proteazlar proteinlerdeki peptit bağlarının kırılmasını kataliz ederler. Çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin yıllık toplam satış tutarı 1 milyar \$'ın üzerindedir. Proteazlar bu pazarda oldukça büyük bir paya sahiptir. Ticari amaçla kullanılan çeşitli enzimlerin pazar payları aşağıda verilmiştir:

<u>Enzim Adı</u>	<u>Pazar Payı (%)</u>
Proteaz	46
Amilaz	18
Reninler	10
Analitik enzimler	10
Karbohidrolazlar	10
Lipaz	3
Tripsin	3

1.2. Proteaz Kaynakları

Proteaz kaynakları bitkisel, hayvansal veya mikrobiyal olabilir. Proteazların farklı canlı gruplarından elde edilebilmesine karşın endüstriyel amaçlı kullanılanlar genellikle mikrobiyal kökenli proteazlardır. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen proteazlar geniş pH aralığında ve değişik sıcaklıklarda reaksiyon verdiklerinden endüstride özellikle tercih edilmektedir (Nduvimana ve ark., 1995; Siezen ve Leunissen, 1996).

Bitkisel kökenli proteazlar özellikle gıda endüstrisinde uzun süredir kullanılmaktadır. Bu nitelikte bir proteaz olan papain *Carica papaya* bitkisinin meyvelerinden elde edilmekte balık ve bitki proteinlerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Godfrey, 1986).

Bitkilerin yetişmesi için elverişli alanlar ve uygun yetiştirme koşullarının bulunmasındaki güçlük ve bitkilerden proteaz eldesinin uzun zaman gerektiren bir uygulama olması bitkisel kaynaklı proteazların kullanımını sınırlayan faktörlerdir (Godfrey, 1986; Rao ve ark., 1998).

Hayvanlardan elde edilen proteazlar arasında tripsin, kimotripsin ve pepsin tıpta ve endüstride kullanılan enzimlerdir. Hayvan pankreasından elde edilen tripsin özellikle deri sanayinde ve medikal alanda kullanılmaktadır. Tripsin, proteinleri hızlı denatüre etmesi nedeniyle gıda endüstrisinde de kullanılır. Yine hayvan pankreasından elde edilen kimotripsin, tanı ve analitik uygulamalarda kullanılmaktadır. Pepsin domuz veya sığır midesinden elde edilen ve hayvansal proteazlar arasında en asidik özellikte olan proteazdır. Pepsin genellikle gıda endüstrisinde peynir yapımında kullanılmaktadır (Godfrey, 1986; Rao ve ark., 1998).

Endüstriyel anlamda önemli olan proteazlar genellikle *Bacillus* cinsine ait organizmalar tarafından üretilmektedir. *Bacillus* proteazları taşıdıkları farklı özellikler nedeniyle gıda endüstrisinden deterjan endüstrisine kadar farklı kullanım alanlarına sahiptir. Farklı pH ve sıcaklık değerlerinde aktivite gösterebilen bu proteazlar ayrıca, bitkisel ve hayvansal kökenli enzimlere göreli olarak daha kolay üretilmektedir (Rao ve ark., 1998).

1.3. Sınıflandırma ve Adlandırma

Barrett ve McDonald (1986) tüm proteolitik enzimlerin sınıflandırılması ve adlandırılması için, peptidaz (peptit bağlarını hidrolize edenler) ve proteaz olmak üzere iki terim belirleyerek terminolojideki sorunları büyük oranda çözmüşlerdir. Proteazlar katalize ettikleri reaksiyon şekline göre ayrıca ekzopeptidazlar ve

endopeptidazlar olmak üzere iki gruba ayrılır (Nduvimana ve ark., 1995; Rao ve ark., 1998). Bu tanımlamada belirleyici olan enzimlerin substratta etkili oldukları bölgedir. Proteazlar katalitik mekanizmalarına göre; serinproteazlar, sisteinproteazlar, aspartikproteazlar ve metalloproteazlar şeklinde ve aktivite gösterdikleri pH aralığına göre de asidik proteazlar, nötral proteazlar ve alkalin proteazlar olarak sınıflandırılırlar. (Nduvimana ve ark., 1995; Rao ve ark., 1998).

1.3.1. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar polipeptit zincirinin amino ya da karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz eder ve etki bölgelerine göre sınıflandırılır. Amino ucundaki peptit bağlarını hidroliz eden ekzopeptidazlar, aminopeptidazlar; karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz edenler ise karboksipeptidazlar olarak adlandırılır. Proteazlar zincirin ilk peptit bağına hidrolizleyen aminopeptidazlardır. Amino ucundaki ikinci peptit bağının hidrolizini katalize eden endopeptidazlar dipeptilaminopeptidazlar olarak bilinir. Karboksipeptidazlar proteinlerin karboksil ucunda etki gösterirler. Gerçek karboksipeptidazlar bu uçtaki son peptit bağına hidrolize ederler. Dipeptidilkarboksipeptidazlar ise karboksi ucta bulunan son peptit bağından bir önceki bağı hidroliz ederler. Aminopeptidazlar ve karboksipeptidazların yanı sıra tanımlanmış iki ekzopeptidaz ailesi bulunmaktadır. Bunlar dipeptitleri hidroliz eden dipeptidazlar ve prostetik gruba bağlı aminoasitlerin karboksil veya amino uçlarındaki peptit bağlarının hidrolizini katalize eden omegapeptidazlardır (Nduvimana ve ark., 1995).

1.3.2. Endopeptidazlar

Hartley 1960 yılında endopeptidazları katalitik mekanizmalarına göre serin proteazlar (E.C. 3.4.21), sistein proteazlar (E.C.3.4.22), aspartat proteazlar (E.C.3.4.23) ve metallo proteazlar (E.C.3.4.24) olmak üzere 4 grup altında sınıflandırmıştır. Endopeptidazlar ekzopeptidazların aksine amino veya karboksil uçlarda bulunan peptit bağları yerine iç kısımlarda bulunan peptit bağlarını hidroliz ederler (Nduvimana ve ark., 1995).

1.3.2.1. Serin Proteazlar

Serin proteazlar aspartik asit (Asp), serin (Ser) ve histidinden (His) oluşan üçlü katalitik yapılar ile karakterize edilirler. Bu yapı içinde serin, substrat ile kovalen bağ oluşturan oldukça reaktif bir elemandır (Nduvimana ve ark., 1995). Serin proteazlar alkali pH değerlerinde aktivite göstermeleri ve kararlılıkları nedeniyle farklı endüstriyel uygulama alanlarına sahip enzimlerdir (Rao ve ark., 1998). Serin proteazlar virus ve mantarlar tarafından da üretilmekle birlikte en yaygın şekilde *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilmektedir. Alkali pH değerlerinde aktif olan bu enzimler geniş bir substrat çeşitliliğine sahiptir. Moleküler ağırlıkları çoğunlukla 18-35 kDa aralığındadır (Rao ve ark., 1998) .

1.3.2.2. Sistein Proteazlar

Sistein proteazlar tiol proteazlar olarak da bilinir ve sistein (Cys), histidin (His) ve aspartik asitten (Asp) oluşan üçlü katalitik yapıları ile karakterize edilirler. Sistein, substrat ile kompleks oluşturulmasında etkili olan rezidüdür. Bu grupta papain ve calpain ailesinden enzimler bulunmaktadır (Nduvimana ve ark., 1995).

1.3.2.3. Aspartat Proteazlar

Aspartat proteazlar asit endopeptidazlar olarak da bilinirler. Bu enzimlerin katalitik bölgeleri iki aspartik asit rezidüsü içermektedir. Bu proteazlar genellikle düşük pH değerlerinde aktivite gösterirler. Moleküler ağırlıkları 30-45 kDa arasındadır. Pepsin, katepsin D ve E ile renin aspartat endopeptidazlardır. Pepstasin tarafından özgün olacak inhibe edilirler (Nduvimana ve ark., 1995).

1.3.2.4. Metalloproteazlar

Bu grup, aktivite mekanizması yönünden diğer proteazlara göreceli olarak, en çok farklılık gösteren enzimleri içerir. Metalloproteazlar aktiviteleri için divalen katyonlara ihtiyaç duyan enzimlerdir. Metalloproteazlarda katyon olarak genellikle çinko (Zn^{+2}) bulunmaktadır. Bu enzim grubu içinde bulunan 30 adet enzim

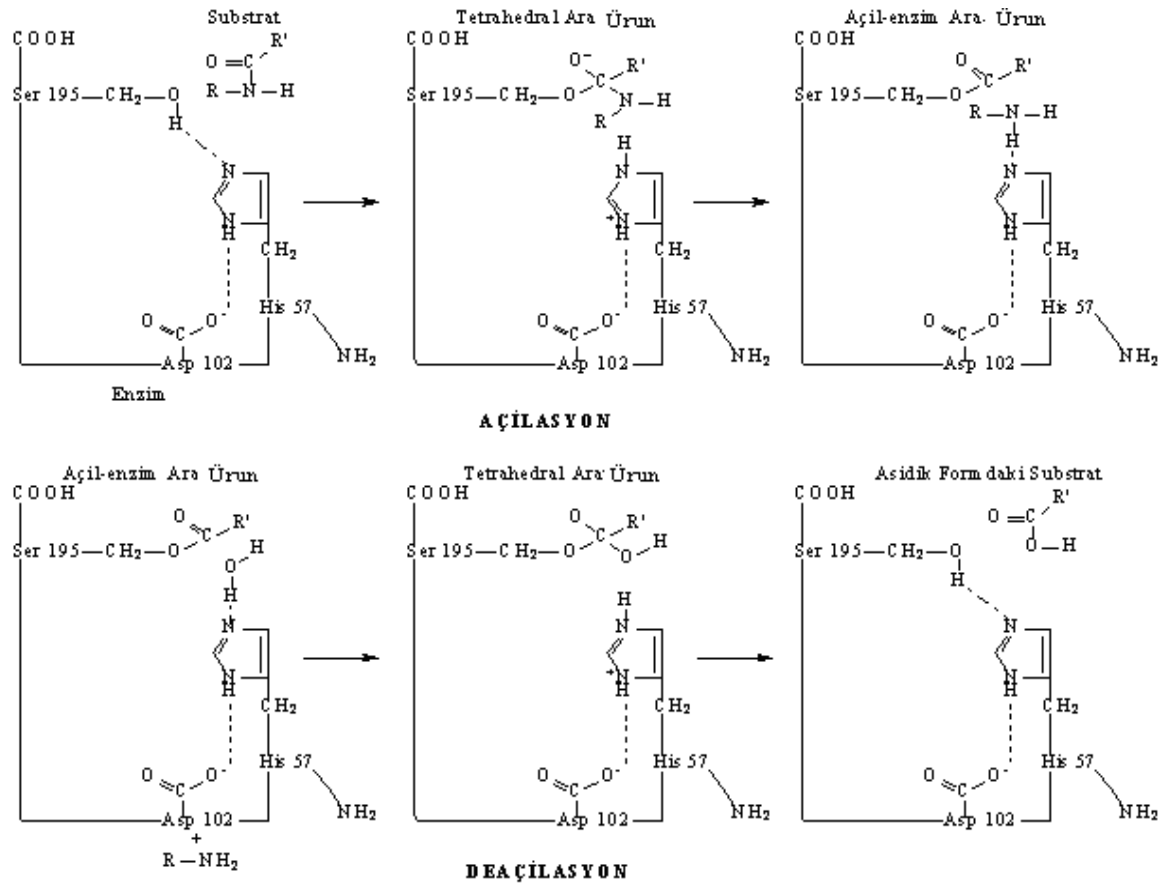
ailesinden 17 tanesi endopeptidaz, 12 tanesi ekzopeptidaz ve birisi hem endopeptidaz hem de ekzopeptidazdır. Metalloproteazlar nötral, alkalen, mikrobakter I ve II olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Nduwimana ve ark., 1995; Rao ve ark., 1998).

1.4. Proteazların Katalitik Mekanizmaları

Bütün endopeptidazlar, aynı biyokimyasal reaksiyonu; peptit bağlarının hidrolizini katalize ederler. Fakat bunların katalitik mekanizmaları arasında farklılıklar vardır. Serin ve sistein endopeptidazlar, katalitik bölgelerindeki aminoasitlerin kuvvetli nükleofilik özellik taşıması nedeniyle substratları ile kovalent ara ürün kompleksi (kovalent kataliz) oluştururlar. Diğer yandan, aspartat endopeptidazlar ve metallo-endopeptidazlar genellikle asit-baz katalitik mekanizması üzerinden etkirler (Nduwimana ve ark., 1995).

1.4.1. Serin Endopeptidazların Katalitik Mekanizması

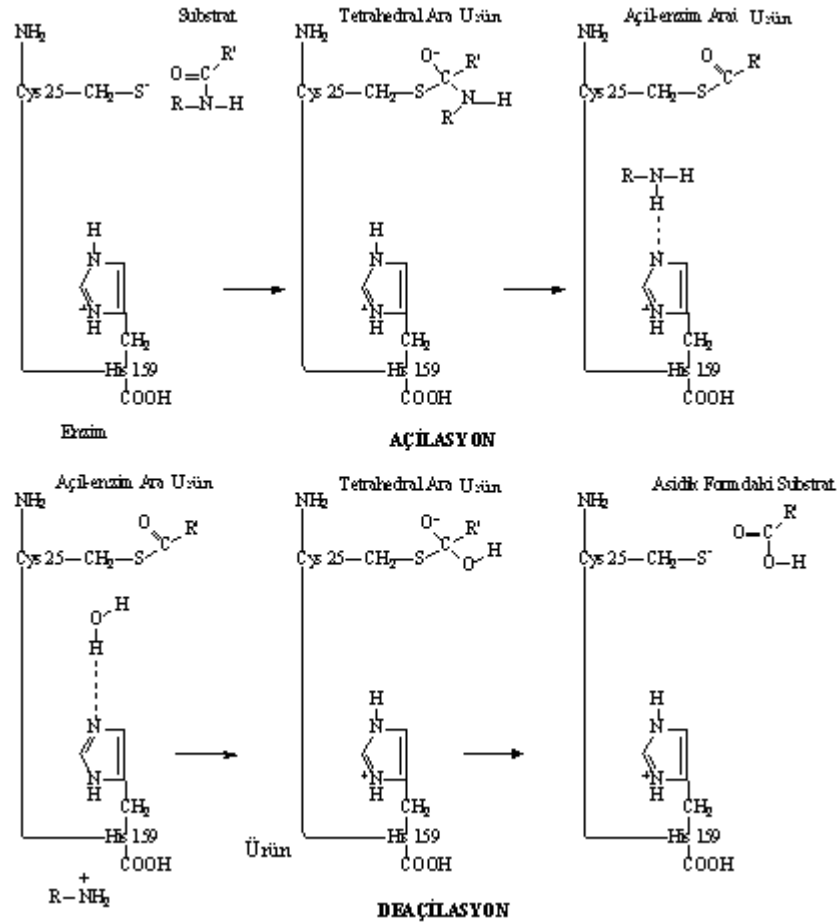
Serin endopeptidazların katalitik mekanizması, kimotripsin örneğinde Şekil 1.1'de gösterilmiştir. Substratın hidrolizi enzimin açılması ve deaçılması olmak üzere birbirini izleyen iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta, kırılacak peptit bağının karbonil grubu, kimotripsinin serin 195 rezidüsü tarafından nükleofilik saldırıya uğrar ve bunun sonucunda kovalen açıl-enzim ara ürünü oluşur. İkinci basamakta ise, su molekülü, peptitin ucunda karboksil grubu oluşacak şekilde kovalen ara ürünün parçalanmasını sağlar. Sırasıyla katılma ve ayrılmadan ibaret olan bu iki basamak, enzimin aktif bölgesinde yer alan ve katalizde rol oynayan histidin 57 ve aspartat 102 amino asitlerinin birbirine yakın konumlarda bulunmaları sayesinde kolaylaşmaktadır (Nduwimana ve ark., 1995; Stryer, 1992; Polgar, 1990).



Şekil 1.1. Serin endopeptidazların katalitik mekanizması.

1.4.2. Sistein Endopeptidazların Katalitik Mekanizması

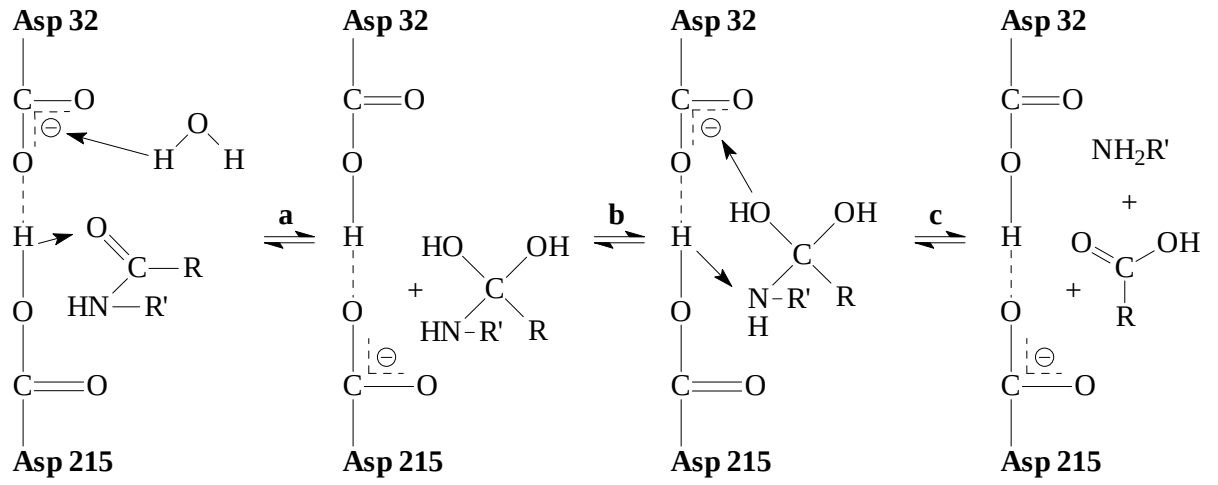
Sistein (tiyol) endopeptidazların katalitik mekanizması papain için örneklenerek, Şekil 1.2’de verilmektedir. Papain yapısında katalizde rol oynayan amino asitler, Cys 25 ve His 159’dur. Sistein endopeptidazlar tarafından kataliz edilen reaksiyonların mekanizması temelde serin endopeptidazlarınkiyle aynıdır. Tek fark, kırılacak peptit bağındaki karbonil grubunun, hidroksil grubu yerine tiyolat iyonu tarafından nükleofilik saldırıya uğramasıdır. Cys 25’teki tiyolat iyonunun kararlılığı komşu His 159 imidazolyum iyonu tarafından desteklenmekte ve onu potansiyel nükleofilik saldırılar için elverişli kılmaktadır (Nduwimana ve ark., 1995; Stryer, 1992; Polgar, 1990).



Şekil 1.2. Sistein endopeptidazların katalitik mekanizması.

1.4.3. Aspartat Endopeptidazların Katalitik Mekanizması

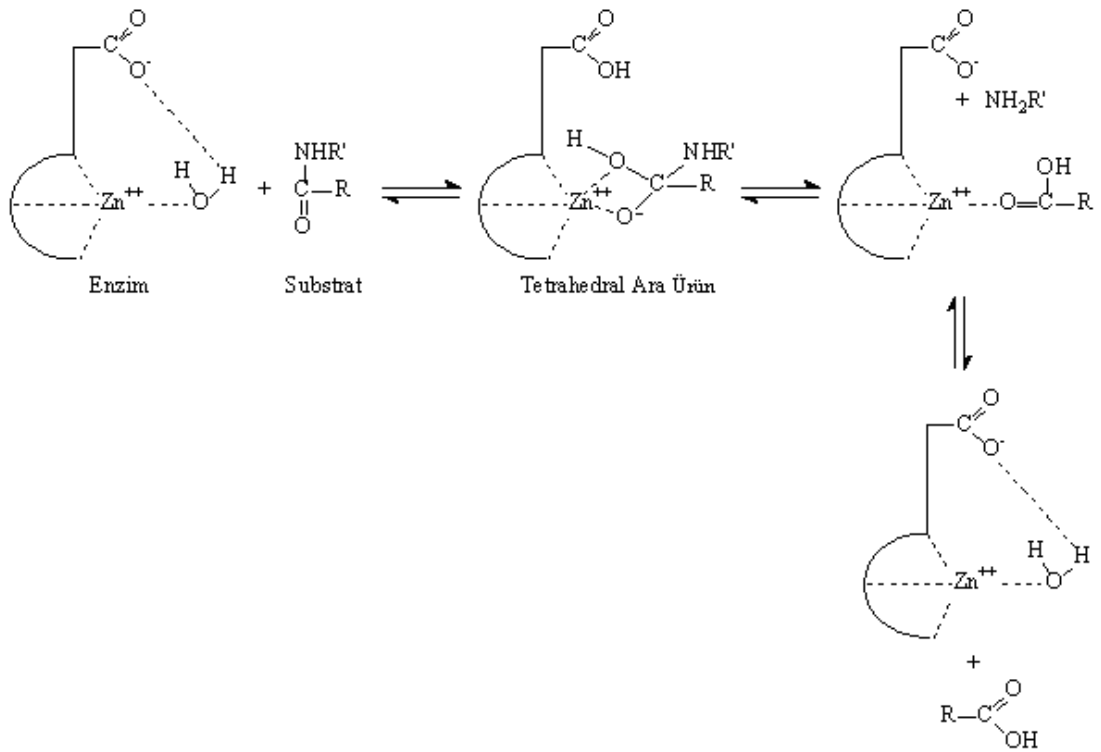
Mekanizma pepsin örneği üzerinde Şekil 1.3'te gösterilmiştir. Katalitik merkezdeki iki aspartik asitin (32 ve 215 numaralı rezidüler) katalitik grupları hidrojen bağı ile birbirine bağlıdır. Aspartat endopeptidazlar, biri su molekülünden aspartik asit 32'nin karboksilat iyonuna, bir diğeri ise aspartik asit 215'in karboksil grubundan substratın karbonil grubundaki oksijene olmak üzere aynı anda meydana gelen iki proton transferi ile (reaksiyon a) nükleofilik saldırıyı kolaylaştırmaktadır. Bu transferler, nötral tetrahedral bir ara ürünün oluşmasına yol açmaktadırlar (reaksiyon b). Aynı çift taraflı transfer mekanizması, aspartik asit 215'in karboksil grubundaki protonu azot atomuna transfer ederken, aspartik asit 32'nin karboksilat iyonuna proton sağlayan bu ara ürünü parçalar (reaksiyon c) (Nduwimana ve ark., 1995; Stryer, 1992; Polgar, 1990).



Şekil 1.3. Aspartat endopeptidazların katalitik mekanizması.

1.4.4. Metallo-endopeptidazların Katalitik Mekanizması

Metallo-endopeptidazlar, Şekil 1.4'te gösterilen mekanizmaya uygun olarak etkir. Suyu bağlı halde bulunan çinko tarafından karbonil karbonuna yapılan nükleofilik saldırı, katalitik bölgedeki glutamik asidin karboksilat iyonu tarafından desteklenmektedir. Tetrahedral ara ürün, glutamik asidin karboksilat iyonundan elimine olan NH₂R' grubuna proton transferi sonucunda parçalanır (Nduwimana ve ark., 1995; Stryer, 1992; Polgar, 1990).



Şekil 1.4. Metallo-endopeptidazların katalitik mekanizması.

1.5. Endüstriyel Açidan Alkalen Proteazlar

Proteazlar global enzim ürünleri satışında önemli paya sahip bir endüstriyel enzim grubu olup, deterjan, protein, mayalama, et, fotoğraf, deri ve mandıra endüstrisinde kullanılmaktadır. Endüstride kullanılan alkalen proteazlar bakteri, fungi ve böcekler gibi farklı kaynaklardan elde edilebilir (Horikoshi ve ark.,1996 Anwar ve Saleemuddin, 1998). Proteazların endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliği bazı faktörlere bağlıdır. Daha önce bu alanda yapılan çalışmalarda proteaz ürünleri için fungal kültürlerde çalışılmış ve ürün miktarının kullanılan tür ve ortama göre fazlasıyla değişken olduğu ortaya konmuştur. Banerjee ve Bhattacharya (1992) yaptıkları çalışmada fungal izolat *Rhizopus oryzae*' den alkalen proteaz elde etmek için kültür koşullarını optimize etmişlerdir. Çalışmada, organik ve inorganik nitrojen kaynakları, metal iyonları, surfaktanlar ve mantar öldürücü ilaçların proteaz üretimi ve ürünleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Organik nitrojenin proteaz üretimini olumlu etkilediği bulunmuş, ancak ekonomik boyutu gözetilerek endüstriyel proteaz üretimi için inorganik tuzlar tercih edilmiştir. İnorganik nitrojen kaynağı olarak % 0,2 sodyum nitrat kullanılmıştır. Metal iyonları (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} ,

Ag^{3+} , Pb^{3+} , Hg^{2+}) ve surfaktanlar (Tween 80, SDS, Triton X-100) proteaz ürünlerini uyarıcı bir etkiye sahiptir. Proteazların etkin üretimine olanak veren süreçlerin geliştirilmesi, alkalen proteazların endüstride birçok alanda kullanılmasında etken olmuştur. Tablo 1’de alkalen proteazların güncel endüstriyel kullanım alanları ve kaynakları görülmektedir. Alkalen proteazların yüksek pH ve sıcaklıklarda, çeşitli surfaktanların varlığında aktivite göstermeleri, onları endüstriyel uygulamalar için elverişli kılmaktadır (Kumar ve Takagi, 1999; Anwar ve Saleemuddin, 1998). Ticari olarak üretilen alkalen proteazların üreticileri, uygulama alanları ve kaynakları Tablo 1.1’de özetlenmiştir (Rao ve ark., 1998).

Tablo 1.1. Bakteriyel Alkalen Proteazlar, Kaynakları, Endüstriyel Uygulama Alanları ve Üreticileri.

Üretici	Ürün ismi	Mikrobiyal kaynak	Uygulama alanı
Novo Nordisk, Danimarka	Alcalase	<i>B. licheniformis</i>	Deterjan, ipek
	Savinase	<i>Bacillus</i> sp.	Deterjan, tekstil
	Esparase	<i>B. lentus</i>	Deterjan, gıda, ipek
	Biofeed pro	<i>B. licheniformis</i>	Yem
	Durazym	<i>Bacillus</i> sp.	Deterjan
	Novozyme 471MP	Belirtilmiyor	Fotoğraf
	Novozyme 243	<i>B. licheniformis</i>	
	Nue	<i>Bacillus</i> sp.	Deri
Genencor International, A.B.D.	Purafact	<i>B. lentus</i>	Deterjan
	Primatan	Bakteriyel kaynaklı	Deri
Gist-Brocades, Hollanda	Subtilisin	<i>B. alcalophilus</i>	Deterjan
	Maxacal	<i>Bacillus</i> sp.	Deterjan
	Maxatase	<i>Bacillus</i> sp.	Deterjan
Solvay Enzymes, Almanya	Opticlean	<i>B. alcalophilus</i>	Deterjan
	Optimase	<i>B. licheniformis</i>	Deterjan
	Maxapem	<i>Bacillus</i> sp.'nin protein	Deterjan
		mühendisliği ile üretilmiş varyantı	
	HT-proteolytic	<i>B. subtilis</i>	Alkol, içki, ekmek, yem, gıda, deri, fotografik atık
	Protease	<i>B. licheniformis</i>	Gıda, atık
Üretici	Ürün ismi	Mikrobiyal kaynak	Uygulama alanı
Amano Pharmaceuticals, Japonya	Proleather	<i>Bacillus</i> sp.	Gıda
	Collagenase	<i>Clostridium</i> sp.	Teknik
	Amano protease S	<i>Bacillus</i> sp.	Gıda
Enzyme Development, A.B.D.	Enzeco alkaline protease	<i>B. licheniformis</i>	Teknik
	Enzeco alkaline protease-L FG	<i>B. licheniformis</i>	Gıda
	Enzeco high alkaline protease	<i>Bacillus</i> sp.	Endüstriyel
Nagase Biochemicals, Japonya	Biopraxe concantrate	<i>B. subtilis</i>	Kozmetik, farmasötik
	Ps. Protease	<i>P. aeruginoso</i>	Araştırma
	Ps. Elastase	<i>P. aeruginoso</i>	Araştırma
	Cryst. Protease	<i>B. subtilis</i> (K2)	Araştırma
	Cryst. Protease	<i>B. subtilis</i> (bioteus)	Araştırma
	Biopraxe	<i>B. subtilis</i>	Deterjan, temizlik
	Biopraxe SP-10	<i>B. subtilis</i>	Gıda
Godo Shusei, Japonya	Godo Bap	<i>B. licheniformis</i>	Deterjan, gıda
Rohm, Almanya	Corolase 7089	<i>B. subtilis</i>	Gıda
Wuxi Synder Bioproducts, Çin	Wuxi	<i>Bacillus</i> sp.	Deterjan
Advance Biochemicals Hindistan	Protosol	<i>Bacillus</i> sp.	Deterjan

1.5.1. Mandıra Endüstrisinde Alkalen Proteazlar

Laktik asit bakterileri, mandıra endüstrisinde peynir ve süt ürünlerinin yapımında çok önemli bir mikroorganizma grubunu oluşturur (Thomas ve Mills, 1981). Bu bakteriler sütte bulunan kazeinin peptit bağlarının kırılmasını sağlayarak, degradatif maya bakterileri olarak çalışırlar. Bu olay peynirin oluşumu boyunca devam eder. Laktik asit bakterileri, peynir imalatında süütün asitlenmesi ve peynirin olgunlaşmasında işlevseldir ve özgün lezzetin oluşumuna da katkıda bulunur. Her iki işlev için proteolitik aktivite temeldir. Peynir endüstrisindeki önemleri nedeniyle son yıllarda maya bakterileri üzerine yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. Laktik asit bakterileri başka besinlerin fermentasyonu ve fermentasyon için uygun ortamın oluşturulmasında da kullanılmaktadır. Proteazlar ayrıca gıda sektöründe bebek maması, diyet ürünleri, meyve suyu gibi ürünlerin üretilmesinde kullanılmaktadır (Anwar ve Saleemuddin, 1998).

1.5.2. Atıkların Yok Edilmesi ve Dönüşümü

Boynuz, tüy, tırnak ve saç gibi fibrilli proteinler doğada atık olarak oldukça bol miktarda bulunmaktadır. Bu atıklar bazı mikroorganizmalardan elde edilen proteazların kullanımı ile kullanılabilir hale dönüştürülebilir veya yok edilebilir. Proteazların proteolitik aktivitesi sayesinde protein içerikli bu atıkların ortadan kaldırılması sağlanmaktadır. Bu etkileri sayesinde proteazlar son zamanlarda atık yönetiminde etkin şekilde kullanılmaktadır. Kümes hayvanlarının atıklarının yok edilmesi proteazların bu tür kullanım alanları arasındadır. Bu sayede atıklar ve tüy birikintileri atık borularından temizlenebilmektedir.

Alkalen proteazlar fotoğrafçılık sektöründe de kullanılmaktadır. Bu alanda kullanılan filmlerin üzerinde, geri dönüşümünün sağlanması koşulu ile önemli miktarda gümüş bulunmaktadır. Gümüş, filmlerin yakılması ile geri kazanılmakta ancak bu yöntemle çevre kirliliğinin artmasına yol açılmaktadır. Proteazların kullanılması, gümüşün geri dönüşümü için çevre dostu bir yöntem olarak görülmektedir. Filmlerin jelatin kısmının enzim tarafından parçalanması ile, üzerinde bulunan gümüş geri kazanılmakta, proteazlar film sektöründe de giderek önemli bir yer edinmektedir (Anwar ve Saleemuddin, 1998).

1.5.3. Deri Endüstrisinde Proteazlar

Deri endüstrisinde enzim kullanımı, hayvan derilerinin daha düzgün bir yüzeye sahip olmasını sağlamaktadır. Bu süreç, hayvan derilerinin doyurulmuş kireç ve sodyum sülfite kullanılarak işlenmesinin yerine kullanılmaktadır. Belirtilen maddelerin kullanıldığı klasik yöntem pahalı olduğundan ve çevreye zararlı atıkların üretilmesine yol açtığından, deri sanayinde enzimlerin kullanılması tercih edilmektedir. Deri işlenmesinin çeşitli basamaklarında kullanılan alkali proteazlar daha kullanışlı deri üretime olanak sağlamaktadır. Bu uygulamada deride istenilmeyen pigmentlerin yok edilmesi, deri yüzeyinden kılların ve tüylerin uzaklaştırılması ve daha düzgün, kullanışlı deri yüzeyinin elde edilmesi işlemlerinde alkali proteazlar kullanılmaktadır (Anwar ve Saleemuddin, 1998).

1.5.4. Deterjan Endüstrisinde Alkali Proteazlar

Bazı enzimler alkali pH'da çalışabildikleri için deterjan endüstrisinde de kullanılmaya başlanmıştır. Deterjanlar proteaz, amilaz, lipaz gibi farklı enzimler içerir. Deterjan katkı maddesi olarak farklı enzimlerin kullanılması protein içerikli lekelerin yanı sıra, nişasta ve karbohidrat lekelerinin de çıkarılmasına olanak sağlar. Enzimlerin deterjan katkı maddesi olarak kullanılmasında etken olan başlıca özellikler alkali pH'da çalışmaları ve deterjanlarla uyumlu olmalarıdır. Daha iyi temizleme performansı ve düşük maliyet proteazların deterjan endüstrisinde kullanımını yaygınlaştırmıştır. Deterjan katkı maddesi olarak kullanılan proteazlar *Bacillus* proteazlarıdır.

Bakteriyel proteazların deterjanlarda kullanılmasındaki temel sorun, mikropsuz enzim üretiminin pahalı filtrasyon yöntemleri gerektirmesidir. Fungal orijinli proteazlar, miselyumun filtrasyon teknikleri ile daha kolay uzaklaştırılmasına bağlı olarak daha avantajlıdır. Bu proteazlar üzerinde yapılan çalışmalar, ticari deterjanlar için uygun özellikleri taşıdıklarını göstermiş, fermentasyon çalışmaları ile etkin proteaz üretimi sağlanmış, ayrıca deterjan endüstrisinde kullanılmak üzere daha ekonomik oldukları bulunmuştur (Kumar ve ark., 1999; Kirk ve ark., 2002).

Deterjan endüstrisinde genellikle subtilisinler kullanılmaktadır. Subtilisinler katalitik mekanizmaları gözetilerek alkali proteazlar olarak tanımlanırlar. Aminoasit dizileri ve üçboyutlu yapıları diğer serin proteazlardan farklıdır. Subtilisinlerin katalitik üçlü yapıları aspartik asit, histidin ve serin içermektedir. Subtilisinlerin molekül ağırlıkları 18–90 kDa arasında değişmekle birlikte deterjanlarda kullanılanlar genellikle 27 kDa büyüklüğündedir. Subtilisinlerin başarılı kullanımının temelinde, yüksek sıcaklıklardaki kararlılık ve yüksek substrat özgüllülüğü gibi nitelikleri yatmaktadır. Bir diğer önemli nokta ise fermentasyon ortamında oldukça kısa sürede üretilibilmeleridir. Bu proteazlar her türlü çamaşır ve bulaşık deterjanlarında kullanılır. İşlevleri kan, süt, yumurta gibi protein içerikli lekelerin azaltılmasıdır (Maurer, 2004).

İdeal deterjan enzimi, yüksek pH da ve 40 °C'a kadarki sıcaklıklarda çalışmalı ve deterjanın daha kısa sürede bozulmasına neden olan oksitlenmeye karşı dayanıklı olmalıdır. Ayrıca deterjan solüsyonu içindeki düşük miktarlarında etki gösterebilmeli ve geniş substrat özgüllüğüne sahip olmalıdır. Bu bağlamda günümüzde deterjan sanayinde kullanılan proteazlar, pH 8–10 değerleri arasında etkili ve protein lekelerine özgül enzimlerdir.

Deterjan katkı maddesi olarak kullanılan enzimler için bir diğer kaynak böcek barsağıdır. Bu nitelikli proteazların avantajı, bakteriyel ve fungal çalışmalardaki gibi pahalı filtrasyon yöntemlerinin gereksinilmemesidir. Anwar ve Saleemuddin, (1997) böcek barsağından elde ettikleri proteaz ile yaptıkları çalışmada enzimin pH 11'de ve 50 °C'ta optimal aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir.

1.6. Saflaştırma Teknikleri

Saflaştırma, belirli bir proteinin ortamda bulunan hücresel elemanlardan ve diğer proteinlerden ayrılması amacıyla gerçekleştirilen işlemler topluluğudur. Saflaştırma sürecinin amacı hedef proteinin, kendisi yitirilmeksizin ortamda bulunan diğer proteinlerin uzaklaştırılmasıdır (Dennison, 2002).

Saflaştırmada ilk olarak ortamda bulunan katı hücresel kısımların sıvı kısımdan uzaklaştırılması hedeflenir. Bu amaçla, saflaştırma yönteminin ilk basamaklarında ardışık santrifüj işlemleri uygulanır. Katı ve sıvı faz birbirinden ayrılırken hedef proteini de içeren sıvı faz ayrılarak kısmen temizlenmiş bir şekilde elde edilir (Scopes, 1994; Dennison, 2002).

1.6.1. Çöktürme

Bu aşamada sıvı faz içindeki proteinlerin kesimlenerek çöktürülmesi ve birbirinden ayrılması amaçlanmaktadır. Çöktürme işlemi temelde protein yüzeyinde bulunan hidrofobik aminoasit rezidülerine dayanır ve sıvı fazdaki protein karışımı üzerine belirli oranda tuz eklenmesi ile bazı proteinlerin çöktürülmesi sağlanır. Tuz eklenmesinin erken basamakları boyunca toplanan protein fraksiyonları daha sonra toplanacak olan fraksiyonlardan daha az çözünür niteliktedir. Çözeltide bulunan serbest su molekülleri tuz eklenmesinin ardından çözelti içinde hareket ederek yerlerinden ayrılır. Bu yer değiştirme sürecinde hidrofobik bölgenin çevresinde bulunan su molekülleri de ayrılacak ve böylece bu bölge üzerindeki kontrol ortadan kalkacaktır. Bu kontrolün yok olmasıyla ilgili protein yüzeyinde su molekülleri sayesinde kurulan düzen yok olacak ve hidrofobik gruplar etkileşim içine girecektir. Bu etkileşimin sonucu olarak proteinler toplanacak ve çökecektir.

Çöktürme işleminde en yaygın şekilde kullanılan tuz amonyum sülfattır. Bunun başlıca nedenleri, amonyum sülfatın diğer tuzlara göre saf ve daha ucuz elde edilmesi, ayrıca suda diğer tuzlardan daha iyi bir çözünürlüğe sahip olmasıdır. Proteinlerin yapılarının bozulmasına engel olur ve proteinlerin kararlı halde kalmasını sağlar.

Çöktürme işlemi için bir diğer yöntem organik çözücülerin kullanılmasıdır. Bu yöntemde hidrofobik bölgeler etrafındaki düzenli su, organik çözücü molekülleri ile yer değiştirir. Bu bölgeler diğer bölgelere göre daha yüksek çözünürlüğe sahip olduğundan yer değiştirme olgusu gerçekleşir. Sonuçta suda çözünebilir proteinlerin çözünme oranı azalır. Böylece korunan proteinler arasında etkileşim gerçekleşir ve proteinler bir araya gelerek çöker.

Ortamda kalan tuz biyolojik aktiviteyi etkileyebileceği gibi daha sonraki saflaştırma basamaklarında iyonik değişmelere de neden olabileceğinden, çöktürme işleminin ardından protein çözeltisinin içindeki tuzun uzaklaştırılması gerekmektedir.

İlgilenilen proteini içeren çözelti, sıklıkla bir sonraki saflaştırma basamağına geçmeden önce ayrıca değiştirilmekte ve proteinler bir sonraki basamak için uygun bir tampon çözeltiye alınmaktadır. Bu amaçla en sık kullanılan yöntem diyalizdir. Kısmen saflaştırılmış özüt yarı geçirgen membran içine alınır. Örneğe göreceli büyük hacimde ve uygun iyonik güçteki tampon çözelti içinde bırakılan membran tuz ve tamponun geçişine izin verir, ancak proteinlere vermez. Böylece diyaliz büyük proteinlerin, membran içinde kalmasını sağlarken, diğer çözünenlerin dışarı çıkmasına izin verir. Diyaliz, amonyum sülfatın hazırlanmış protein materyalinden ayrılması için en sık kullanılan yöntemdir.

Bundan sonraki saflaştırma basamaklarında amaç; ilgilenilen proteinin diğer proteinlerden daha büyük oranda ayrılmasıdır. Bu aşamada kromatografik yöntemler kullanılır. Kromatografik yöntemler eliyle proteinler büyüklüklerine, iyonik yüklerine veya seçilmiş bir moleküle afinitelerine göre birbirlerinden ayrılabilir. Kullanılacak kromatografik yöntem, çalışılan proteinin özelliklerine göre belirlenir.

1.6.2. Kromatografik Yöntemler

Bazı afinite kromatografisi uygulamaları bir yana, kromatografik yöntemlerde çalışılacak örnek, daha önce geçilen basamaklarda diğer hücresel elemanlardan arındırıldığı için yalnızca farklı proteinleri içermektedir. Bu aşamada hedef, istenilen proteinin örnekteki diğer proteinlerden ayrılmasıdır. Saflaştırılmak istenen proteinin özelliğine bağlı olarak kromatografik yöntemlerden biri veya bir kaç uygulanabilir. Kromatografik yöntemlerin ana ilkesi tutunmadır.

1.6.3. Kolon Kromatografisi

Proteinlerin fraksiyonlar halinde toplanması için kullanılan önemli yöntemlerden birisi kolon kromatografi yöntemidir. Bu yöntemde proteinin yükü, büyüklüğü, bağlanma afinitesi ve diğer özelliklerinden yararlanır. Uygun kimyasal

özellikleri taşıyan geçirgen katı materyal (hareketsiz faz) kolon içine yerleştirilir ve tampon çözelti (hareketli faz) bu katı fazdan kolon boyunca geçirilir. Protein içeren çözelti kolona yüklenir ve katı matriks boyunca hareketli fazla birlikte gittikçe genişleyen bantlar şeklinde ilerler. Proteinler kolon çıkışından fraksiyonlar halinde toplanır.

1.6.3.1. Jel Filtrasyon

Jel filtrasyon yöntemi ile proteinler büyüklüklerine göre birbirinden ayrılır. Jel granüllerini içeren matriks kolona uygun tampon içinde yerleştirilir. Farklı moleküler büyüklükteki proteinler bu kolon boyunca birbirinden ayrılır. Büyük moleküller granüllerin porları dışında kalacak ve böylece kolondan daha önce süzülecektir. Küçük moleküller ise granüllerin içine gireceklerinden daha geç süzüleceklerdir. Ayırmak istenilen proteinlerin büyüklüklerine veya ayırma yaptığımız işlem için seçilen aralığa göre, toplam kolon hacmi içinde granüllerin dışında kalan hacim önem taşımaktadır. Çünkü ayrılacak olan proteinlerin süzüleceği ve ayrılmayı sağlayacak olan aralık bu boşluklardır. Bu yöntem kullanılırken kolonun alt kısmının istenilen proteinden önce boş olmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca kullanılacak kolon hazırlanırken ve kullanılırken kolon içinde hava kabarcıklarının oluşmamasına ve matriksin kurumamasına çok özen göstermek gerekir. Kolon kromatografisinde oldukça sık kullanılan matriksler, Sefadex ve Sefaroz'dur (Streeter ve ark., 2002).

1.6.3.2. İyon Değişim Kromatografisi

Proteinler özgün pH'larda anyonik (-), katyonik (+) ya da "zwitterion" (net yüke sahip değil) olarak bulunabilen moleküllerdir. İyon değişim kromatografisi proteinlerin bu özelliklerine dayanan bir yöntemdir. Farklı yüklere sahip olan proteinler bu yöntemle birbirlerinden ayrılabilir. Negatif ya da pozitif olarak yüklenmiş moleküller kendilerine zıt yüklü olan işlevsel gruplara bağlanabilir. Bu yöntem, uygun matrikslerle hazırlanan anyon değişim kromatografisi veya katyon değişim kromatografisi olarak uygulanır.

Anyon değişim kromatografisinde; pozitif olarak yüklenmiş işlevsel gruplar çözünmez matrikse bağlanır. Pozitif yüklü matriks üzerine karşı yüklü iyonlar

tutunur. Negatif yüklü proteinler matriks üzerindeki karşı yüklerle yer değiştirerek matrikse bağlanabilir. Zıt yüklü proteinler, daha sonra uygun tampon kullanılarak matriks üzerinden ayrılır. Ayırma olayı proteinlerin iyon değiştiriciler üzerine bağlanma derecelerine bağlıdır. Bu şekilde kurulmuş bir düzenekte negatif yüklü olan protein grupları matriks içinde yüklerinin birbirlerine göreceli fazlalığı ile orantılı şekilde ilerleyeceklerdir. Fakat pozitif yüklü proteinler matriksle etkileşime girmediklerinden kolonda en hızlı ilerleyen gruplar olacaklar ve böylece proteinler yüklerinden yararlanılarak ayrılacaklardır. Alkalen proteazlar genellikle pozitif yüklü olup anyon değiştiricilere bağlanmazlar. Dolayısıyla alkalen proteaz saflaştırmalarında, daha çok katyon değiştiriciler kullanılır. Kolona bağlanan moleküller pH veya tuz gradyanı kullanılarak daha etkin şekilde ayrılabilir.

İyon değişim kromatografisinde pozitif yüklü proteinlerin ayrılması için Karboksimetil (CM-), Sülfopropil (SP-) gibi katyon değiştirici kolonlar kullanılabilir. Negatif yüklü proteinlerin ayrılması söz konusu olduğunda ise Kuaterner amonyum (Q-) ya da Dietilaminoetil (DEAE-) gibi anyon değiştirici kolonlar kullanılmaktadır (Streyer ve ark., 2002).

1.6.4.3. Afinite Kromatografisi

Bir diğer kromatografik ayırma yöntemi de afinite kromatografisidir. Bu yöntem proteinlerin özgün olarak bağlandığı grupların varlığına ve bağlanma özgülüğüne dayalı bir yöntemdir. Kolon, üzerinde özgün proteinlerin bağlanmasına elverişli özgün ligantlar bulundurmaktadır. Kolona, üzerindeki liganta ilgisi olan proteinler bağlanırlar. Diğerleri ise kolona bağlanmadıkları için yıkama tamponu ile birlikte ilerleyerek süzülür ve böylece ayrılma sağlanmış olur.

Bu kromatografik yöntemde ayrılmak istenen her molekül için özgün ligantlar mevcuttur. Enzimler için substrat analogu, kofaktör, inhibitör ve bağlayıcı proteinler; hormon ve vitaminler için reseptör ve taşıyıcı proteinler ligant olarak kullanılabilir. Afinite kromatografisinde ligant bir “spacer” ile matriks üzerine bağlanır ve bu liganta özel proteinin gelip buraya bağlanması yoluyla, tutunma ve diğer proteinlerden ayrılma işlemi gerçekleştirilmiş olur. Kromatografi işleminin doğru bir

şekilde yapılabilmesi için kullanılan matrikslerin şu özelliklere sahip olması gerekmektedir: Matriks çözünmez yapıda olmalıdır. Ligant bağlanması için uygun grupları taşımalıdır. Örneğe bağlanma boyunca hareketsiz olmalıdır. Örneğe kimyasal olarak herhangi bir etkisi olmamalıdır. İyi bir süzülme için her yerinde aynı özelliklere sahip olmalıdır (Streier ve ark., 2002).

1.7. Tezin Amacı

Enzimler günümüzde endüstriyel olarak birçok alanda kullanılmakta ve kullanımları giderek artmaktadır. Bu anlamda üretim maliyetleri, zaman, kalite ve performans birlikte gözetilmekte, dış etkenlerden olabildiğince bağımsız ve farklı sıcaklık/pH değerlerinde aktivite gösterebilen enzimleri üreten yeni soyların tanımlanması ve/veya geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır.

Bu tez çalışmasında alkalen proteaz kaynağı olarak öncelikle, İşsever-Öztürk ve ark. (2002) tarafından geliştirilen ve *Bacillus licheniformis* ATCC 53926 soyuna ait alkalen proteaz genini taşıyan rekombinant *apro*-pUC19-*E.coli* JM 109 hücreleri denendi. Rekombinant *E.coli* JM 109 hücreleri ile beklenen enzim üretimi gerçekleşmediğinden, GYTE Enzim Moleküler Genetiği Grubu tarafından yerel ekosistemlerden toplanan örneklerden izole edilerek tanımlanan endüstriyel enzim üreticisi bakteri soylarından birisinin (*Bacillus* sp. GYTE-L1) biyolojik kaynak olarak kullanılması kararlaştırıldı.

Tez çalışmasının amacı, GYTE Enzim Moleküler Genetiği Grubu tarafından yerel kaynaklardan izole edilerek tanımlanan *Bacillus* sp. GYTE-L1 soyunun besi yerine salgıladığı alkalen proteazın üretilmesi, saflaştırılması ve nitelendirilmesidir.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Sarf Malzemesi

Kullanılan Malzemeler

Üretici Firma

2-Propanol	RIEDEL 24137
3-5-dinitrosalisilik asit	SIGMA D 0550
Akrilamit	SIGMA A 8099
Akuazid	SIGMA
AlCl ₃	BAKER
Amonyum per sülfat	BIORAD 161-0700
Amonyum sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄	MERCK 1.01216.1000
Asetik Asit	RIEDEL 27225
β-Merkaptoetanol	SIGMA M-6250
BaCl ₂	FLUKA
Bisakrilamit	BIORAD 161-0201
Bradford Protein Assay	BIORAD 500-0006
Brillant Blue R	SIGMA B 7920
Bromofenol blue	SIGMA B-6131
CoCl ₂	SIGMA C 2644
CaCl ₂	SIGMA C-3306
CTAB (Setil trimetil amonyum bromid)	Sigma H 6269
CuCl ₂	SIGMA C-6641
DMSO (Dimetilsülfooksit)	SIGMA D 5879
DTT (Ditiotreitol)	Promega V 3151
EDTA (Etilendiamintetraasetikasit)	SIGMA E 5134
Etanol	J. T. BAKER 8228

Etilen Glikol	MERCK
FeCl ₃	MERCK
FeSO ₄	SIGMA F-7002
Folin	SIGMA F9252
Glisin	SIGMA G 7126
Gliserol	RIEDEL 15524
HCl	RIEDEL 0.7102
KCl	RIEDEL 12636
NaCO ₃	MERCK 106392
Lizozim	BOEHRINGER MANNHEIM
Lugol	SIGMA L 6146
Maltoz	SIGMA M 2250
MnCl ₂	MERCK 105917
MgCl ₂	MERCK 105832
NaCl	MERCK 1.06400.1000
NaH ₂ PO ₄	RIEDEL 0.4269
Na ₂ HPO ₄	MERCK 1.06586
NaOH	MERCK 1.06462.1000
Kazein (Casein from bovine milk)	SIGMA C5890
NiCl ₂	SIGMA N 5756
NH ₄ Ac	RIEDEL
Nutrient Broth	DIFCO 234000
PMSF (Fenil metil sülfonil florid)	SIGMA 7626
Protein Standartı	SIGMA SDS-6H
Q-sepharose Fast Flow (Anyon değiştirici rezin)	Amersham Biosciences AB 17-0510-01
SDS	SIGMA 5750
Sephacryl S-200 High Resolution (Moleküler elek kromatografi rezini)	Amersham Biosciences AB 17-0584-10
Sodyum Asetat	RIEDEL 25022

Sodyum deoksikolat	SİGMA
Sodyum potasyum tartarat	SIGMA S 2377
Streptomisin sülfat	SİGMA
TEMED	SIGMA T 7024
Trikloro asetik asit	RIEDEL 27242
Tris baz	SIGMA T-1503
Triton X-100	MERCK
Tween 20	SIGMA P 1379
Yeast ekstrakt	MERCK 1.03753
ZnCl ₂	FLUKA 96468
ZnSO ₄	ALDRICH 22,137-6

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihazlar

Üretici Firma

+4 °C Soğutucu	ARİSTON NOFROST
-20 °C dondurucu	ARİSTON NOFROST
-80 °C dondurucu	HERAEUS INSTRUMENT
Buz Makinesi	BAR LINE BF 85
Etüv	EDMUNT BÜHLER-TH 15
Fraksiyon toplayıcı	BIORAD 2110
Gradyan pompası	BIORAD Econogradient Pump
Güç kaynağı	BIORAD POWER PACK 1000
Hassas Terazî	SARTORIUS-BL 210S
İnkübatör	CERTOMAT-BS-T
Jel kurutucu	E-C Apparatus Corporation EC 355
Jel kurutucu pompası	E-C Apparatus Corporation EC 353
Manyetik Karıştırıcı	HEİDOLPH MR3001
Masa Üstü Santrifüj	HERAEUS Sepatech, Biofuge 15R
Masa Üstü Santrifüj	BECKMAN COULTER, Allegra 25R

Microsantrifüj	BECKMAN Microfuge 18
Mikrodalga Fırın	BEKO-1550
Orbital Karıştırıcı	BIOMETRA WT12
Otoklav	HIRAYAMA-HICLAVE HVE-50
Otoklav	VARIOKLAV-Dampfsterilizator 300
Otomatik Pipet 5000 µl	GILSON
Otomatik Pipet 1000 µl	GILSON
Otomatik Pipet 200 µl	GILSON
Otomatik Pipet 20 µl	GILSON
pH Metre	İNOLAB pH LEVEL 1
Protein Elektroforezi Sistemi	BIORAD Mini Protean II
Recorder	BIORAD Econorecorder 1327
Spektrofotometre	BIORAD-Smartspec 3000
Steril Kabin	HERAEUS-Herasafe-HS 12
Sterilizatör	BİNDER-ED115
Su Banyosu	JULABO-SW 21
Su Banyosu	JULABO-MP 13
Su Banyosu	Techne TE-10A
Terazi	SARTORIUS-BL 3100
UV monitörü	BIORAD EM1 Econo UV Monitor
Vorteks	IKA-MS 2-Minishaker

2.2. Yöntemler

2.2.1. Enzim Kaynağının Seçilmesi

Bu tez çalışmasında biyolojik kaynak olarak öncelikle, İşsever-Öztürk ve ark. (2002) tarafından geliştirilen ve *Bacillus licheniformis* ATCC 53926 soyuna ait alkalen proteaz genini taşıyan rekombinant *apro-pUC19-E.coli* JM 109 hücreleri denendi. Rekombinant *E.coli* JM 109 hücreleri ile beklenen enzim üretimi gerçekleşmediğinden, GYTE Enzim Moleküler Genetiği Grubu tarafından yerel ekosistemlerden toplanan örneklerden izole edilerek, tanımlanan endüstriyel enzim

üreticisi bakteri soylarından birisinin enzim kaynağı olarak kullanılması kararlaştırıldı. Bu amaçla *Bacillus* sp. GYTE-L1, *Bacillus* sp. GYTE-L10, *Bacillus* sp. GYTE-L13 ve *Bacillus* sp. GYTE-P21 soyları ile hücre kültürü çalışmaları başlatıldı. Bu soyların her birisi için yapılan büyüme eğrisi ve enzimatik aktivite çalışmaları sonucunda *Bacillus* sp. GYTE-L1 soyunun biyolojik kaynak olarak kullanılmasına karar verildi.

Bacillus sp. GYTE-L1 soyu, GYTE Enzim Moleküler Genetiği Grubu'nun endüstriyel enzim üreticisi yerel bakteriyel soyları tarayarak izole ettiği çalışmada, lipaz seçici besi yerinde (% 2,5 Zeytin yağı, % 0,8 Nutrient broth, % 0,4 NaCl, % 2 Agar, % 1 Arabik gum, % 0,001 Rodamin B) öncelikle lipaz üreticisi bir soy olarak seçilmiştir (Balci, 2004). Seçici besi yerinde lipaz üreten soyların çevresinde yağ hidrolizine bağlı olarak açığa çıkan yağ asitleri, floresan bir boya olan Rodamin B ile etkileşmekte ve kolonilerin çevresinde 312 nm UV ışığı altında görülebilen turuncu zonlar oluşturmaktadır.

L1 soyu, Gönen Dağ Ilıcası'ndan alınan, doğal sıcaklığı 43°C ve pH'sı 7.0 olan su örneğinden izole edilmiştir. İlk izolasyonu 30°C'ta ve pH, 10.0 besi yerinde yapılan L1 soyu, lipaz için seçici besi yerlerinin (pH, 7 ve 10.0) her ikisinde de 6 mm çapında zon oluşturmuş, ancak alkali besi yerindeki zon daha parlak gözlenmiştir (Tuzlakoğlu ve ark., 2003; Balci, 2004).

Lipaz seçici besi yeri üzerinde taranarak seçilen bakterinin tanımlanması, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinden yola çıkılarak yapılmıştır (Bailey and Scott, 1994; Turnball and Kramer, 1995). L1 soyu; koloni ve mikroskopik morfolojisi ve biyokimyasal test sonuçları ile *Bacillus subtilis*/*Bacillus firmus* olarak nitelendirilmiştir. Ancak BIOMERIEUX firması tarafından *Bacillus* cinsini tanımlamak için geliştirilen API 50 CHB/ E kiti ve tam otomatik bir tanımlama sistemi olan VITEK sisteminin *Bacillus* kiti kullanılarak yapılan tanımlamalarda; L1 soyu, her iki sistem tarafından *Bacillus pumilus* olarak adlandırılmıştır. Tanımlamada kullanılan bu iki otomatik sistemin L1 soyunu *Bacillus pumilus* olarak belirlemesini takiben, laboratuvarında yapılan manuel testlerin bazıları tekrarlanmış, nişasta hidrolizinin negatif çıkması sonucu, bu soyun *Bacillus pumilus* olarak adlandırılmasına karar verilmiştir (Tuzlakoğlu ve ark., 2003; Balci, 2004). Ancak

planlanan moleküler tiplendirme çalışmaları tamamlanarak gerekli doğrulama yapılarak L1 soyunun, *Bacillus* sp. GYTE-L1 olarak anılması daha uygun bulunmuştur.

L1 soyunda lipaz aktivitesi 5. saatte görülmeye başlanmış, hızlı bir şekilde artarak, 10. saatte en yüksek değere ulaşmıştır. Aktivite 10. saatten sonra ani bir düşüş göstererek, daha sonraki saatlerde aynı düzeyde kalmıştır (Balcı, 2004).

Aynı zamanda proteaz ürettiği belirlenen L1 soyu, % 4 jelatin içeren NB sıvı besi yerinde (Kaneke *et. al.*) büyütülerek aktivite testine alınmıştır (Battal, M, 2004). Proteaz üreten yerel soylar arasında küçük hacim sıvı besi yerinde enzim üretkenliği yönünden öne çıkan soylardan birisi olan GYTE-L1 soyu için, öncelikle optimal enzim üretimine olanak veren besi yeri bileşimi, havalandırma oranı, büyüme sıcaklığı ve kültürün çalkalama hızı gibi değişkenler optimize edilmiştir. Bu amaçla LB, NB, % 1 ve % 4 jelatin içeren NB besi yerleri farklı pH'larda hazırlanarak denenmiştir. Aşılama oranının yanı sıra, ana kültürün; -20 °C stokları ile doğrudan veya bir gece büyütülmüş ön kültürler eliyle aşılandığı koşullardaki üretkenlik test edilmiştir. Buna göre, -20 °C stoklarından aşılanarak gece boyu büyütülmüş ön kültürlerden % 1 aşılama oranıyla, % 4 jelatin içeren pH 7 NB sıvı besi yerinde 37 °C'ta, 170 rpm'de ve kültür/flask hacminin 1/5 olduğu koşullarda büyütülen L1 soyunun etkin şekilde alkalen proteaz ürettiği gözlenmiştir (Battal, M, 2004).

2.2.2. Hücre Kültürünün Hazırlanması

Ön kültür hazırlamak üzere, 2 ml LB Broth besi yeri, GYTE-L1 hücrelerinin -20 °C'ta korunan stok kültürü ile 1/100 oranında aşılandı. Hücreler 37 °C'ta 170 rpm'de gece boyu çalkalanarak büyütüldü.

Ana kültürler bir önceki gece büyütülen ön kültürler kullanılarak aşılandı. Önkültür ile 1/100 oranında aşılanan ve % 1 jelatin içeren Nutrient Broth besi yeri 37 °C'ta 170 rpm'de çalkalanarak gece boyu büyütüldü. İnkübasyon boyunca belirli zaman aralıklarında alınan örneklerle yapılan hücre büyümesi (A_{600}) ve alkalen

proteaz aktivitesi (A_{660}) testlerinin ardından, enzim üretiminin 64. saatte en yüksek düzeye ulaştığı belirlendi.

2.2.3. Kültür Üst Sıvısının Toplanması

Daha önce Tuzlakoğlu ve arkadaşları (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, izole edilen ve nitelendirilen *Bacillus* sp. GYTE-L1 soyu tarafından üretilen enzimin kültür ortamına salındığı belirlenmiştir.

Ana kültür belli aralıklarla örnek alınarak izlendi. İnkübasyon, enzim üretimi ve kültür ortamına salınımının en yüksek olduğu 64. saatte durduruldu. Kültür 10.000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan üst sıvı toplandı.

2.2.4. *Bacillus* sp. GYTE-L1 Alkalen Proteazının Saflaştırılması

2.2.4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Bölüm 2.2.3’te anlatıldığı şekilde toplanan üst sıvı iki kat 3 MM Whatman filtre kağıdından süzüldü. Süzülen kültür üst sıvısının 500 ml’sine son konsantrasyonu % 80 olacak şekilde amonyum sülfat eklenerek, çözüldü ve gece boyu + 4 °C’da düşük hızda karıştırıldı. Daha sonra bu karışım iki eşit hacme ayrılarak ertesi sabah 10.000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından, üst sıvı atılarak elde edilen iki amonyum sülfat çökeleği daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -20 °C’da saklandı.

2.2.4.2. Kromatografi

Saflaştırma işleminin optimizasyonu için, amonyum sülfat çökeleklerinden bir tanesi, önce jel filtrasyon (Sefakril S200) ve ardından iyon değişim (Q-sefaroze) kromatografisi, diğeri ise ilk olarak iyon değişim (Q-sefaroze) ve ardından jel filtrasyon (Sefakril S100) kromatografisinin kullanıldığı saflaştırma çalışmalarına alındı.

2.2.4.3. Kromatografi Rezinleri ve Kolonların Hazırlanması

Q-sefaroze, anyon değiştirici özelliği taşıyan bir rezindir. Q-sefarozenin materyali, çapraz bağlı agaroz birimleridir ve fonksiyonel grup olarak da kuaterner amonyum ($-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) içermektedir.

Sefakril S-200 jel filtrasyon rezini, 25–75 μm çapındaki boncuklardan oluşmaktadır. Bu boncuklar, allil dekstran / N,N'- metilenbisakrilamit birimlerinin çapraz bağlanması ile elde edilirler.

Q-sefaroze, Sefakril S-200 ve Sefakril S-100 matriksleri % 20 etanol içinde ve şişirilmiş halde sağlandı. Rezinlerdeki etanol atılarak, üzerlerine rezin hacminin % 75'i oranında yükleme tamponu eklendi. Karıştırılarak, çökmesi sağlandı ve bu işlem birkaç kere tekrar edildi. Jel-tampon karışımı degaze edildi. Cam kromatografi kolonu yıkandı, kurutuldu ve kolonun tabanına cam pamuğu yerleştirildikten sonra rezin tek seferde kolon içerisine yüklendi. Kolon tamamen dolduktan sonra uygun tamponla yıkanarak dengelendi.

2.2.4.4. Kromatografi alışmaları

Birbirine paralel olarak yapılan işlemler sonucu elde edilen amonyum sülfat çökeleklerinden birisi 2 ml 50 mM Tris, % 15 Gliserol, 0,1 M NaCl, 7 mM β -merkaptoetanol (B-ME), pH 7,5 çözeltisi içinde çözüldü. Bu özelti eppendorf tüplerine dağıtılarak 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı alınarak 0,45 μm çapındaki filtreden süzüldü. Elde edilen süzüntü (2.4 ml) daha önce 50 mM Tris, % 15 Gliserol, 0,1 M NaCl, 7 mM B-ME, pH 7,5 çözeltisi ile dengelenmiş Sefakril S200 kolonuna yüklendi. Aynı tampon çözelti ile gerçekleştirilen kolon kromatografi süresince toplanan fraksiyonlarda aktivite testi ve SDS-PAGE analizi yapıldı. Aktivite testi ve SDS-PAGE sonuçlarına göre 40–84. tüplerde bulunan fraksiyonlar toplanarak bir 'havuz' oluşturuldu. Havuz hacmi 20.850 ml olarak ölçüldü. Daha sonra diyaliz membranına aktarıldı ve aquasid ile + 4 $^{\circ}\text{C}$ 'ta gece boyu konsantre edildi. Diyaliz membranı içindeki konsantre örnek 50 mM Tris, % 15 Gliserol, 7 mM B-ME, pH 8.0 çözeltisine karşı +4 $^{\circ}\text{C}$ 'ta gece boyu diyaliz edildi. Diyalizden alınan örnek 0,45 μm filtreden süzüldü ve Q-sefaroze kolonuna

yüklendi. Kolon süresince toplanan fraksiyonlarda yapılan aktivite testi ve SDS-PAGE analizleri sonuçları gözetilerek, 16-50. tüplerde bulunan fraksiyonlar toplandı ve oluşturulan havuzun hacmi 5.450 ml olarak belirlendi.

İkinci çökelek 2,5 ml 50 mM Tris, % 15 Gliserol, 7 mM B-ME pH 8.0 çözeltisinde çözüldü ve diyaliz membrana aktarıldı. Gece boyu +4 °C'ta diyalizde bırakıldı. Diyaliz sonrası örnek (5 ml) eppendorf tüplerine dağıtılarak 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan üst sıvı (4,8 ml) alınarak 13.000 rpm'de tekrar 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı (4,1 ml) 0,45 µm filtreden süzöldükten sonra, 50 mM Tris, % 15 Gliserol, 7 mM B-ME pH 8.0 çözeltisi ile dengelenmiş olan Q-sefaroze kolonuna yüklendi. SDS-PAGE ve aktivite testleri sonuçlarına göre, 16-32. fraksiyonlar toplanarak oluşturulan havuz diyaliz membrana aktarıldı ve Aquasid ile +4 °C'ta gece boyu konsantre edildi. Daha sonra 50 mM Tris, % 15 Gliserol, 0,1 M NaCl, 7 mM B-ME, pH 7,5 çözeltisine karşı gece boyu +4 °C'ta diyaliz edildi. Diyalizden çıkan örnek (800 µl) aynı tampon ile dengelenmiş Sefakril S100 kolonuna yüklendi. Sefakril S100 kolonundan elde edilen fraksiyonlarda yapılan SDS-PAGE ve aktivite testi analizleri sonuçlarına göre, 37-45. fraksiyonlar arası havuz 1, 46-49. fraksiyonlar havuz 2, 34-36. fraksiyonlar havuz 3 ve 54-56. fraksiyonlar havuz 4 olarak toplandı. Önce iyon değiştirici, ardından Sefakril S-100 jel filtrasyon kromatografisinin kullanıldığı ikinci yöntem daha etkin bulundu. Daha sonraki nitelendirme çalışmalarında bu saflaştırma şeması kullanılarak kısmen saflaştırılan enzim (Havuz 1) kullanıldı.

2.2.5. Alkalen Proteaz Aktivite Testi

- 50 µl örnek temiz bir eppendorf tüpüne alınarak üzerine 250 µl Glisin-NaOH tamponu içinde çözülmüş % 0,6'lık kazein eklenir ve vorteks ile karıştırılır.
- Örnek, 30 °C sıcaklıktaki su banyosunda 20 dakika inkübe edilir.
- 250 µl TCA çözeltisi eklenerek, vorteks ile iyice karıştırılır ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
- Eppendorf tüp içindeki örnek 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Üst sıvının 200 µl'si temiz bir cam tüpe aktarılır ve üzerine 1 ml 0.5 M Na₂CO₃ eklenerek vorteksle iyice karıştırılır.

- Üzerine 200 µl 1:2 seyreltilmiş Folin's Reagent eklenir ve vorteksle karıştırılır.
- Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra enzim içermeyen tampon ile hazırlanan köre karşı spektrofotometrede A_{660} okunur.

Glisin-NaOH tamponu: 50 mM Glisin, 50 mM NaCl, pH 10,5

TCA Çözeltisi: 0,11 M TCA, 0,22 M Sodyum Asetat, 0,33 M Asetik Asit

2.2.6. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

- Glisin-NaOH tamponu içinde çözünmüş L-tirozin, kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında standart olarak kullanılır.
- 50 µg/ml L-tirozin çözeltisi hazırlanır ve bu çözelti kullanılarak iki set halindeki L-tirozin dilüsyonları Tablo 2.1' de belirtilen şekilde yapılır.

Tablo 2.1. Kalibrasyon eğrisi için L-tirozin dilüsyonlarının hazırlanması.

Tüp No	Kör	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
L-tirozin 50 µg/ml	(µl)	-	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Glisin tamponu	(µl)	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	-
Tüpte L-trozin miktarı	(µg)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

- 1 ml 0,5 M Na_2CO_3 eklenir ve vorteksle karıştırılır.
- 200 µl 1:2 seyreltilmiş Folin's Reagent eklenerek vorteksle karıştırılır ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilir.
- Örnekler spektrofotometrede A_{660} 'da köre karşı ölçüm yapılarak değerlendirilir.
- Her iki setin A_{660} değerlerinin ortalaması alınarak L-tirozin miktarlarına (apsis) karşı ortalama A_{660} değerlerinin (ordinat) yerleştirilmesi ile elde edilen grafikten, eğim hesaplanır ve enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılır.

Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

1 ünite enzim, 1 dakikada 1 mmol tirozin oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Toplam reaksiyon hacmi = 0,55 ml

Kullanılan enzim hacmi = 0,05 ml

Renk gelişimi için kullanılan hacim = 0,2 ml

Reaksiyon süresi = 20 dakika

$MA_{\text{Tirozin}} = 181,2 \text{ g/mol}$

$$\text{Aktivite} = \frac{\frac{A_{660}}{\text{Eğim}} \times \frac{1000}{MA_{\text{Tirozin}}} \times \frac{\text{Toplam Reaksiyon Hacmi}}{\text{Renk Gelişimi için Kullanılan Hacim}}}{\text{Kullanılan Enzim Hacmi (ml)} \times \text{Reaksiyon Süresi (dakika)}}$$

2.2.7. SDS-Poliakrilamit Jel Elektroföresi (SDS-PAGE), Nativ PAGE ve Zimogram Analizi

SDS-PAGE analizi proteinlerin moleküler ağırlıklarının ve saflık derecelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan bir yöntemdir. SDS-PAGE analizinde ilgili proteinin moleküler büyüklüğü, çeşitli protein belirteçleri yardımıyla belirlenir. Tez çalışması kapsamında SDS-PAGE analizinden ayrıca, uygulanan kolon kromatografileri sonucunda elde edilen fraksiyonların protein profillerinin belirlenmesinde ve havuzların oluşturulmasında yararlanılmıştır.

Derişim jeli ve ayırma jeli hazırlandıktan sonra 10 µl enzim örneği üzerine 5 µl “cracking” tampon eklenerek elle karıştırıldı. 5 µl protein belirteç çözeltisine 5 µl “cracking” tamponu eklenerek moleküler ağırlık belirteci hazırlandı. Kısa süreli santrifüjün ardından örnekler 5 dakika kaynatıldı. Tekrar kısa süreli santrifüjün ardından örnekler jele yüklenip derişim jelinde 100 V’ta, ayırma jelinde 200 V’ta yürütüldükten sonra jel boyama çözeltisinde hafifçe çalkanarak boyandı. Boyanan jel arıtma çözeltisi içine alındı.

Jel Hazırlığı

- İki adet elektroforez camı aralarına ayırıcılar konularak kasete yerleştirilir.
- Ayırma jeli hazırlanarak pipet yardımıyla camların arasına dökülür.
- Jelin üzerine izobutil alkol eklenerek, oda sıcaklığında polimerize olması beklenir.
- Ayırma jeli polimerize olduktan sonra, üzerindeki alkol dökülür ve jelin üstü distile su ile yıkanır. Jelin üzerinde kalan su kurutma kağıdı ile alınır.
- Ayırma jelinin üzerine, derişim jeli dökülerek taraklar takılır ve jelin oda sıcaklığında polimerize olması beklenir.
- Polimerizasyon tamamlandıktan sonra taraklar çıkarılır ve kuyular 1X elektroforez tamponu ile yıkanır.

Ayırma Jeli

H ₂ O	: 750 µl
0,75 M Tris, % 0,2 SDS, pH 8,8	: 3750 µl
% 30 Akrilamit, % 1 Bisakrilamit	: 3000 µl
% 10 APS	: 90 µl
TEMED	: 6 µl

‘Cracking’ Tampon

50 mM Tris-HCl, pH 6.8, % 1 SDS,
 2 mM EDTA,
 % 1 β-merkaptoetanol,
 % 10 gliserol,
 % 0,002 Bromofenol blue

Derişim Jeli

H ₂ O	: 1050 µl
0,25 M Tris, % 0,2 SDS, pH 6,8	: 1500 µl
% 30 Akrilamit, % 1 Bisakrilamit	: 390 µl
% 10 APS	: 60 µl
TEMED	: 3 µl

Nativ (Denatüran içermeyen) PAGE Analizi

Native-PAGE analizi proteinlerin üç boyutlu yapıları ve yüklerine göre ayrılması ilkesine dayanan bir analizdir. Native-PAGE analizi için SDS-PAGE analizinden farklı olarak derişim ve ayırma jelleri SDS içermeyen tamponlar kullanılarak hazırlandı. Örnekler hazırlanırken SDS ve B-ME içermeyen yükleme tamponu kullanıldı ve örnekler kaynatılmaksızın jele yüklendi. Elektroforez derişim jelinde 80 V ve ayırma jelinde 120 V'ta gerçekleştirildi ve bromofenol mavisinin jelden çıkmasından 45 dakika sonra durduruldu. Yürütme işleminin ardından jel boyama çözeltisinde hafifçe çalkalanarak boyandı ve arıtma çözeltisi içine alındı.

Zimogram Analizi

Zimogram analizi için hazırlanan jelde, SDS-PAGE analizinden farklı olarak ayırma jeline son konsantrasyon 2 mg/ml olacak şekilde jelatin eklendi. İki şekilde hazırlanan örneklerden birincisinde 10 µl enzim örneği üzerine 10 µl yükleme tamponu (Native PAGE Dye), ikincisinde ise aynı miktarda enzim örneği üzerine SDS-PAGE “cracking” tamponu eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Ardından kuyulara yüklenen örnekler, derişim jelinde 80 V'ta, ayırma jelinde 120 V'ta olmak üzere boyalar jelden çıkana kadar + 4 °C'ta yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, renatürasyon tamponunda oda sıcaklığında 30 dakika hafifçe çalkalanarak yıkandı. Görüntüleme tamponunda oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen jel, daha sonra boyama çözeltisi ile boyanarak arıtma çözeltisi içine alındı.

Kullanılan Çözeltiler

“Native PAGE DYE” (Yükleme tamponu): 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; % 20 Gliserol; % 0,04 SDS; % 0,005 Bromofenol Mavisi

Renatürasyon Tamponu: % 2,5 Triton X-100

Geliştirme Tamponu: 50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 5 mM CaCl₂, % 0,02 Tween 80.

SDS-PAGE Boyama Çözeltisi: % 0,1 Coomassie Brilliant R250, % 10 asetik asit, % 40 etanol

SDS-PAGE Arıtma Çözeltisi: % 5 asetik asit, %50 etanol

2.2.8. Protein Miktarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi

Boya-bağlanması olarak da bilinen Bradford yöntemi, hızlı ve yüksek duyarlılıkta olması nedeniyle en çok tercih edilen protein miktar tayini yöntemidir. Bu yöntemde kullanılan Coomassie Blue G-250 boyası, asit içerisinde çözüldüğünde kırmızı-kahverengi bir renk oluşmaktadır. Boyanın pozitif yüklü proteinlere bağlanması ile oluşan mavi renk, 595 nm dalga boyunda ölçülerek, protein miktarı tayin edilir (Scopes, 1994).

Belirlenen miktardaki enzim örneği, distile su ile 800 µl'ye tamamlanır. Üzerine 200 µl Coomassie Blue G-250 boyası eklenen örnekler, 5 dakika oda sıcaklığında bekletilip, spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda protein içermeyen köre karşı okunur.

Bradford yöntemi için kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Bradford analizi için kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında, sığır serum albumini (BSA) standart olarak kullanılmaktadır. Konsantrasyonu 0.1 mg/ml olacak şekilde hazırlanan BSA çözeltisinden, 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 µl alınarak tüplere konulur ve distile su ile 800 µl'ye tamamlanır. Her bir tüpe 200 µl Bradford boyası eklenerek, spektrofotometrede, 595 nm dalga boyunda BSA içermeyen köre karşı okunur. Verilmiş BSA konsantrasyonlarına (apsis) karşı elde edilen A₅₉₅ değerlerinin (ordinat) yerleştirilmesi ile oluşturulan grafiğin eğimi, toplam protein miktarının hesaplanmasında kullanılır.

Tablo.2.2. Bradford kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve toplam protein miktarının hesaplanması

Tüp no	Eklenen BSA (0.1mg/ml) miktarı	Distile su
1	-	800
2	20 µl (2 µg)	780
3	40 µl (4 µg)	760
4	60 µl (6 µg)	740
5	80 µl (8 µg)	720
6	100 µl (10 µg)	700
7	120 µl (12 µg)	680

Toplam protein miktarı:
A595 / Eğim / örnek hacmi (µl)

2.3. Alkalen Proteazın Nitelendirilmesi

Kısmen saflaştırılan alkalen proteaz enzimini nitelendirmek üzere yapılan çalışmalarda, öncelikle enzimin optimal sıcaklık ve optimal pH değerleri belirlendi. Bu amaçla değişik sıcaklık ve pH değerlerindeki aktivite belirlendi. Ayrıca enzimin kararlı olduğu sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesi için enzim farklı sıcaklık ve pH değerlerinde inkübe edildikten sonra, aktivite testi yapıldı. Enzim aktivitesi üzerinde metal iyonlarının etkisini belirlemek üzere, enzim çeşitli metal iyonlarının bulunduğu tamponlara alındı ve aktivite testi yapıldı. Deterjanların enzim üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla çeşitli deterjanların varlığında enzim aktivite tayini yapıldı. Bunların yanı sıra alkalen proteaz enziminin aktivitesi üzerinde etkili olduğu bilinen farklı kimyasal maddelerin, kısmen saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerindeki etkileri test edildi.

Belirlenen optimal reaksiyon sıcaklığı ve optimal pH değerleri, daha sonraki nitelendirme çalışmalarında yapılan tüm aktivite testlerinde uygulandı.

2.3.1. Optimum Reaksiyon Sıcaklığının ve Sıcaklık Kararlılığının Belirlenmesi

Optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi için alkalen proteaz aktivite testi 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 °C sıcaklıklarda yapıldı. Belirtilen sıcaklıklarda iki set halinde çalışıldı. Yapılan aktivite testleri sonuçlarına göre enzim için optimum reaksiyon sıcaklığı belirlendi ve daha sonra yapılan nitelendirme çalışmalarındaki aktivite testleri bu sıcaklıkta gerçekleştirildi.

Kısmen saflaştırılan enzimin sıcaklık kararlılığını belirlemek üzere, 50 mM Tris, pH 9.0 tamponu ile 1/100 oranında seyreltilmiş enzim çözeltisi 20, 30, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C'ta 15 dakika inkübe edildikten sonra aktivite testine alındı. Oda sıcaklığında (20 °C) 15 dakika bekletilen enzim örneği için elde edilen aktivite % 100 kabul edilerek, her bir örnek için kalan aktivite hesaplandı

2.3.2. Optimum Reaksiyon pH'sının ve pH Kararlılığının Belirlenmesi

Optimum reaksiyon pH'sının belirlenmesi amacıyla pH 6.0, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5 ve 12.0 değerlerinde çift set şeklinde çalışıldı. Bu çalışmalarda daha önce optimum reaksiyon sıcaklığı olarak belirlenen 50°C değeri uygulandı. Çalışmalarda her bir tüp için 1/100 oranında seyreltilmiş 50 µl enzim örneği kullanıldı. Çalışmada yalnızca substrat olarak hazırlanan kazein çözeltisinin hazırlandığı tamponların pH değerleri değiştirildi. Optimum pH çalışmalarında; pH 6.0, 7.0 ve 8.0 için 50 mM sodyum fosfat, pH 7.0, 8.0, 8.5, 9.0 değerleri için Tris, pH 9.0, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5 ve 12.0 değerleri için Glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Verilen tamponlarda ve pH değerlerinde enzim aktivite testi yapılarak, optimal pH değeri belirlendi. Optimum reaksiyon pH'sı 9.0 olarak belirlendiği için, bu aşamadan sonraki aktivite testlerinde Glisin-NaOH, pH 10,5 yerine Tris pH 9.0 tamponu kullanıldı.

Enzimin pH kararlılığını belirlemeye yönelik çalışmalarda, enzim farklı pH'lardaki tamponlarla 1/100 oranında seyreltilmiş, yaklaşık 40 saat boyunca +4 °C'ta bekletilmiş ve aktivite testine alınmıştır. pH kararlılığında, pH 5.0 ve 6.0'da 100 mM Asetat tamponu, pH 6.0 ve 7.0'de 100 mM Fosfat tamponu, pH 7.0, 8.0 ve

9.0'da Tris tamponu ve pH 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0'de 100 mM Glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır. Her bir örnek için kalan aktivite, pH 9.0'daki aktivite değerleri % 100 kabul edilerek belirlenmiştir.

2.3.3. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi

Bazı metal iyonlarının proteaz aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmada belirli iyonların klorla oluşturduğu tuzlar (AlCl_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 , KCl , MgCl_2 , MnCl_2 , NaCl , NiCl_2 , ZnCl_2), demir ve çinkonun sülfat bileşikleri (FeSO_4 , ZnSO_4) ve NH_4 kullanıldı. Yapılan çalışmalarda ikişer set halinde, 1 mM ve 10 mM tuz içerecek şekilde hazırlanan örneklerle çalışıldı. Enzim oranının toplam hacme oranı 1/100 olacak şekilde hazırlanan örnekler 30 °C' ta 60 dakika bekletildikten sonra proteaz aktivite testi 50 °C'ta gerçekleştirildi. Aktivite testinde kontrol olarak 50 mM Tris, pH 9.0 tamponu ile hazırlanmış tuz eklenmemiş enzim örneği kullanıldı.

2.3.4. Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Deterjanların enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmada % 0,1 ve % 1 deterjan içeren örneklerle çalışıldı. Bu testlerde CTAB (setil trimetil amonyum bromid), SDS (Sodyum Dodesil Sülfat), sodyum deoksikolat, Triton X-100 ve Tween 20 kullanıldı. Deterjan eklendikten hemen sonra 37 °C su banyosunda 60 dakika bekletildikten sonra, tüplerden 50'şer μl örnek alınarak, ikişer set halinde hazırlanan temiz eppendorf tüplerine aktarıldı ve aktivite testi 50 °C'ta yapıldı. Aktivite testinde kontrol olarak 50 mM Tris, pH 9.0 tamponu ile hazırlanmış ve deterjan içermeyen örnek kullanıldı.

2.3.5. Çeşitli Organik Çözücülerin Enzim Aktivitesine Etkisi

Organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmada % 10 ve % 30 organik çözücü içeren örneklerle çalışıldı. Bu çalışmada organik çözücü olarak aseton, etil alkol, metil alkol, izopropanol, izoamil alkol, dimetilsülfooksit (DMSO) ve asetonitril kullanıldı. Hazırlanan örnek tüpleri 40 °C'ta 60 dakika bekletildi ve her bir tüpten alınan 50 μl örnek ile proteaz aktivite testi ikişer set halinde 50 °C'ta gerçekleştirildi. Aktivite testinde kontrol olarak 50 mM Tris, pH 9.0 tamponu ile hazırlanmış ve organik çözücü içermeyen örnek kullanıldı.

2.3.6. Bazı İnhibitörler ve Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çeşitli kimyasalların enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi için yapılan bu çalışmada inhibitör madde olarak etilendiamintetraasetikasit (EDTA), fenil metil sülfonil florid (PMSF), β -merkaptöetanol (B-ME) ve ditiotireitol (DTT) kullanıldı. EDTA, PMSF ve B-ME için 10 mM, DTT için ise 0.5, 1 ve 10 mM son konsantrasyonlarda çalışıldı. Hazırlanan örnekler 37 °C' ta 5, 10 ve 30 dakika bekletildikten sonra proteaz aktivite testi ikişer set halinde ve 50 °C'ta gerçekleştirildi. Aktivite testinde kontrol olarak 50 mM Tris, pH 9.0 tamponu ile hazırlanmış ve inhibitör içermeyen örnek kullanıldı.

2.3.7. Çeşitli Maddelerin Enzim Aktivitesi ve Sıcaklık Kararlılığı Üzerine Etkisi

Bazı efektör maddelerin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada son konsantrasyonu % 10 ve % 30 olacak şekilde gliserol, etilen glikol ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi efektör maddelerle çalışıldı. Bir diğer efektör madde olan etilendiamintetraasetikasit (EDTA) 5mM, CaCl₂ ise 1, 2, 5 ve 10 mM son konsantrasyonlarda test edildi. Örnekler 50 °C'ta 30 ve 60 dakika bekletildi. Her bir tüpten verilen zamanlarda 50'şer μ l örnek alınarak, proteaz aktivite testleri iki set halinde ve 50 °C'ta gerçekleştirildi. Aktivite testlerinde kontrol olarak 50 mM Tris, pH 9.0 tamponu ile hazırlanmış ve efektör madde içermeyen örnek kullanıldı. 10 mM CaCl₂ varlığındaki enzim aktivitesi ayrıca 60 °C sıcaklıkta test edildi ve örnekler bu sıcaklıkta 30 ve 60 dakika bekletildi. Tüplerden verilen zamanlar sonunda paralel olarak alınan 50 μ l hacmindeki iki örnek için standart aktivite testi 50 °C'ta gerçekleştirildi.

Bu çalışmada ayrıca son konsantrasyonu 5 mM olan EDTA'nın enzim aktivitesi ve sıcaklık kararlılığı üzerindeki etkisi 10 mM CaCl₂ içeren örneklerin bir grubunun 37 °C ve diğer grubunun 60 °C'ta yukarıda belirtilen sürelerde inkübe edildiği koşullarda değerlendirildi.

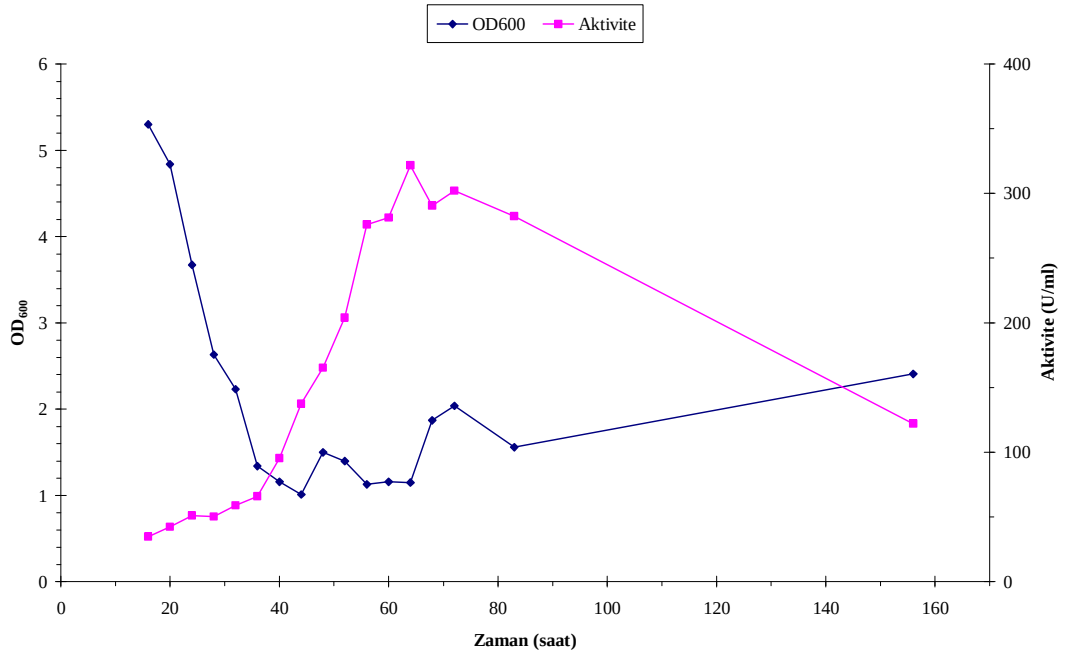
3. BULGULAR

3.1. Yerel İzolat *Bacillus* sp. GYTE-L1 Alkalen Proteazının Üretilmesi ve Saflaştırılması

3.1.1. *Bacillus* sp. GYTE-L1 Alkalen Proteazının Üretilmesi

Bacillus sp. GYTE- L1 soyunda hücre büyümesi ve alkalen proteaz üretiminin optimizasyonu amacıyla yapılan çalışmada, GYTE-L1 soyunun önceden hazırlanmış –20 °C stok kültürü, LB Broth besiyerinin aşılmasında kullanıldı. 1/100 oranında aşılanaan önkültür 37 °C’ta 170 rpm’de çalkalanarak gece boyu inkübe edildi.

Ana kültür çalışmasında, % 1 jelatin içeren Nutrient Broth besi yeri, gece boyu büyütülen önkültür ile 1/100 oranında aşılandı ve 37 °C’ta 170 rpm’de çalkalanarak inkübe edildi. Kültür süresince belirli aralıklarla alınan örneklerde hücre büyümesi (OD₆₀₀) ve aktivite (OD₆₆₀) tayini yapıldı. Bu çalışma ile kültürde en iyi hücre büyümesi ve enzim aktivitesi değerlerinin alındığı zaman aralığı belirlendi. Hücre büyümesi ve enzim üretimi yönünden en uygun zamanın kültürün 64. saati olduğu sonucuna varıldı ve saflaştırma çalışmaları için enzim üretiminin yapıldığı kültürler 64. saatte toplandı (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. *Bacillus* sp. GYTE-L1'in büyüme eğrisi ve enzim üretimi

3.1.2. *Bacillus* sp. GYTE-L1 Alkalen Proteazının Kültür Üst Sıvısından Saflaştırılması

Bacillus sp. GYTE-L1 alkalen proteazı iyon değişim Q-Sefaroz ve Sefakril S-100 jel filtrasyon kolonlarının kullanıldığı süreç ile kısmen saflaştırıldı.

Kültürün toplanmasından itibaren tüm saflaştırma basamakları boyunca elde edilen örneklerde gerçekleştirilen Bradford testleri ile örneklerde bulunan toplam protein miktarı belirlendi. Aynı şekilde tüm örnekler için gerçekleştirilen alkalen proteaz aktivite testi ile de örneklerdeki enzim aktivitesi belirlendi. Örneklerin, toplam aktivitesi, protein konsantrasyonu, spesifik aktivite ve saflaştırma verimi hesaplanarak, alkalen proteaz saflaştırma tablosu (Tablo 3.1) oluşturuldu.

Daha önce açıklanan şekilde büyütülen *Bacillus* sp. GYTE-L1 kültürü enzim aktivitesinin en iyi olduğu noktada durduruldu ve 10000 rpm de 20 dakika santrifüj edilen kültürden elde edilen üst sıvı alınarak, enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kültür üst sıvısında yapılan Bradford testi ile, toplam protein miktarı 142,857 mg bulundu. Kültür üst sıvısındaki alkalen proteazın spesifik aktivitesi 0.78 U/mg protein olarak belirlendi.

% 80 amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen çökelekte yapılan Bradford ve aktivite testi ile toplam protein miktarı ve spesifik aktivite belirlendi. Buna göre % 80 amonyum sülfat çökeleğindeki protein miktarı 19,488 mg ve spesifik aktivite 2,87 U/mg protein bulundu.

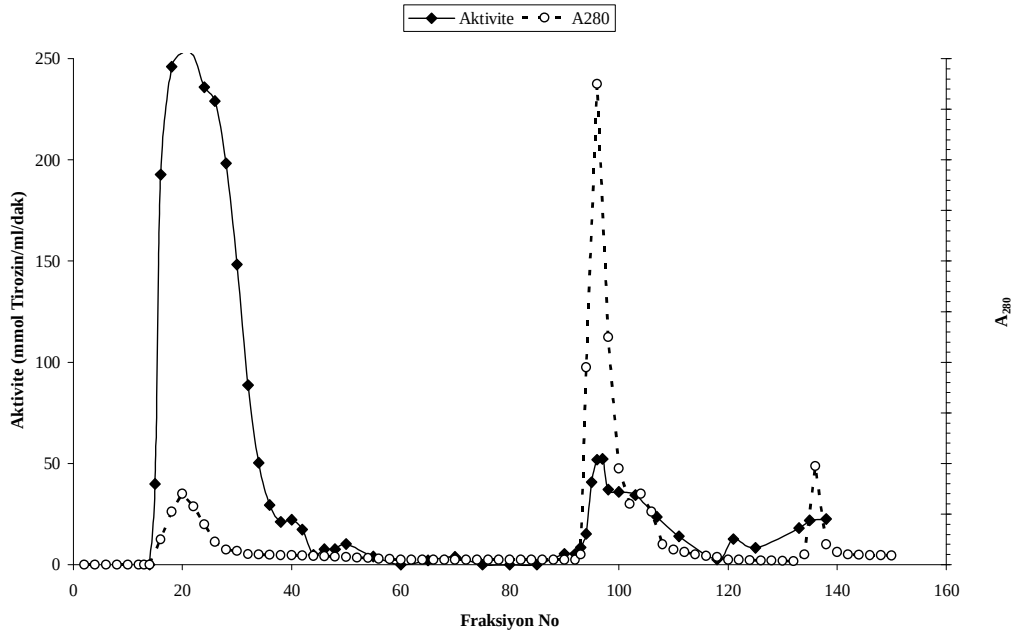
Amonyum sülfat çöktürmesinin ardından diyaliz ve santrifüj işlemlerinden geçirilen örnek Q-sefaroze kolon kromatografisine alındı. Kolon sonrası elde edilen aktif fraksiyonların birleştirilmesi ile oluşturulan havuzda yapılan testler sonucunda toplam protein miktarı 1.318 mg, spesifik aktivite ise 16,86 U/mg protein bulundu.

Q-sefaroze iyon değişim kolonunun ardından sefakril S100 jel filtrasyon kolonuna yüklenecek olan fraksiyonların belirlenmesinde ve bu kolonun ardından enzim kaynağı olarak kullanılacak olan havuzlara alınacak fraksiyonların belirlenmesinde aktivite testi ve SDS-PAGE analizi sonuçları birlikte değerlendirildi.

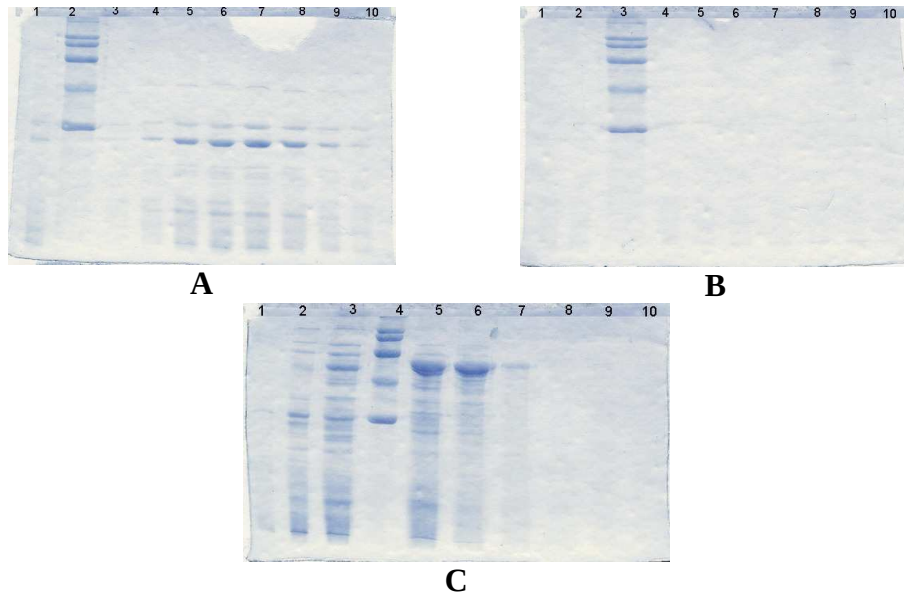
Sefakril S100 kolonundan elde edilen aktif fraksiyonların birleştirilmesi ile oluşturulan 4 havuzdan havuz 1, nitelendirilme çalışmalarında enzim kaynağı olarak kullanıldı. Havuz 1 için toplam protein miktarı 700 µg ve spesifik aktivite 81,8 U/mg protein bulundu.

3.1.2.1. Q-Sefaroze İyon Değişim Kromatografisi

Q-sefaroze kolonu sonucunda elde edilen fraksiyonların A_{280} ve aktivite testi değerleri Şekil 3.2.'de ve SDS-PAGE profilleri Şekil 3.3'te görülmektedir.



Şekil 3.2. Q-sefaroze iyon değişim kromatografisi fraksiyonları A_{280} ve enzim aktivitesi grafiği.



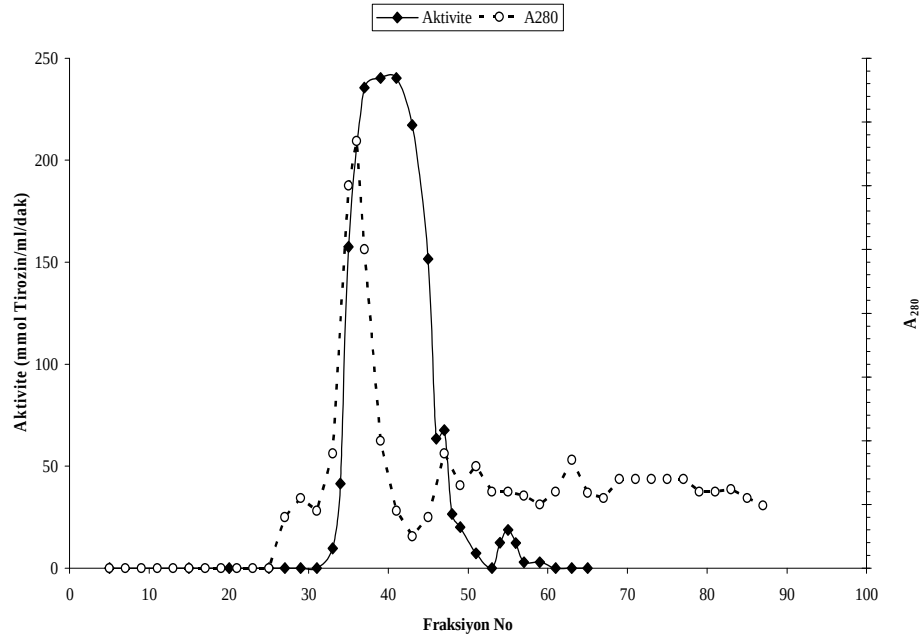
Şekil 3.3. Q-sefaroze fraksiyonlarının SDS-PAGE profili. Jel A: 1. Kolon öncesi; 2. Moleküler ağırlık belirteci; 3. 15. fraksiyon; 4. 16. fraksiyon; 5. 18. fraksiyon; 6. 20. fraksiyon; 7. 22. fraksiyon; 8. 24. fraksiyon; 9. 26. fraksiyon; 10. 28. fraksiyon. Jel B: 1. 30. fraksiyon; 2. 32. fraksiyon; 3. Moleküler ağırlık belirteci; 4. 34. fraksiyon; 5. 36. fraksiyon; 6. 38. fraksiyon; 7. 40. fraksiyon; 8. 42. fraksiyon; 9. 44. fraksiyon; 10. 46. fraksiyon. Jel C: 1. 93. fraksiyon; 2. 94. fraksiyon; 3. 95. fraksiyon; 4. Moleküler ağırlık belirteci; 5. 97. fraksiyon; 6. 100. fraksiyon; 7. 107. fraksiyon; 8. 133. fraksiyon; 9. 135. fraksiyon; 10. 138. fraksiyon .

Şekil 3.2’de görülen aktivite testi sonuçları ve Şekil 3.3’deki SDS-PAGE sonuçları gözetilerek; Q-sefaroze kolonunun 16–32. fraksiyonlarının birleştirilmesi ile oluşturulan havuz diyaliz membrana aktarıldı ve aquasid ile gece boyu konsantre edildi. Önce uygun tampon içinde diyaliz edilen örnek (Bölüm 2.2.4.4) Sefakril S100 kolon kromatografisine alındı.

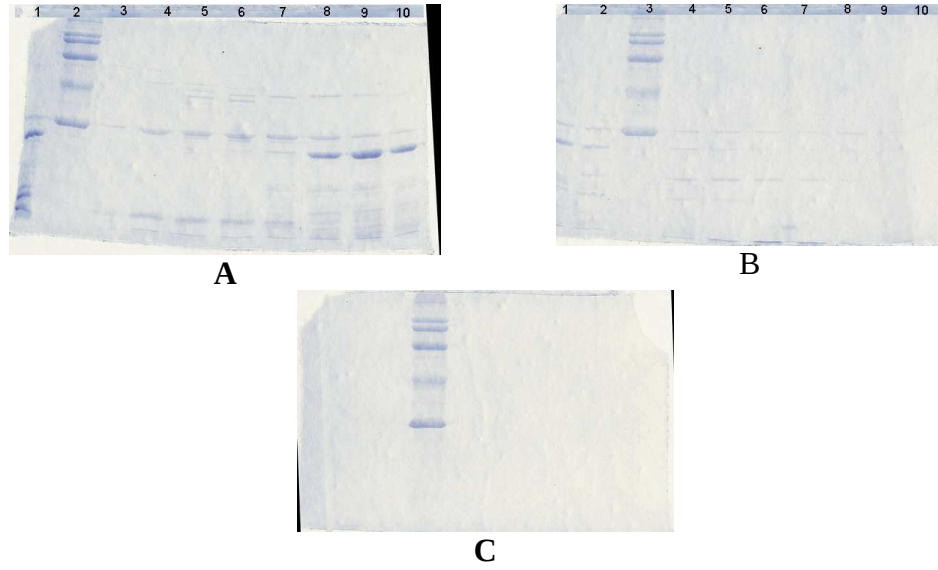
3.1.2.1. Sefakril S-100 Jel Filtrasyon Kromatografisi

Q-Sefaroz 16-32 aktif fraksiyonlarının birleştirilmesi ile elde edilen protein havuzu önce konsantre, daha sonra diyaliz edildikten sonra jel filtrasyon kromatografisine uygulandı.

Sefakril S100 jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlarda yapılan enzim aktivite testleri (Şekil 3.4) ve SDS-PAGE analizleri (Şekil 3.5) sonucunda 4 havuz oluşturuldu. Bölüm 2.2.5.’te belirtildiği şekilde hazırlanan bu havuzlardan havuz 1 (37–45. fraksiyonlar) daha sonraki enzim nitelendirme çalışmalarında enzim kaynağı olarak kullanıldı.



Şekil 3.4. Sefakril S100 kromatografisi fraksiyonları A280 ve enzim aktivitesi grafiği.



Şekil 3.5. Sefakril S100 fraksiyonlarının SDS-PAGE profili. Jel A: 1. Kolon öncesi; 2. Moleküler ağırlık belirteci; 3. 27. fraksiyon; 4. 29. fraksiyon; 5. 33. fraksiyon; 6. 34. fraksiyon; 7. 35. fraksiyon; 8. 37. fraksiyon; 9. 39. fraksiyon; 10. 41. fraksiyon. Jel B: 1. 43. fraksiyon; 2. 45. fraksiyon; 3. Moleküler ağırlık belirteci; 4. 47. fraksiyon; 5. 49. fraksiyon; 6. 51. fraksiyon; 7. 53. fraksiyon; 8. 55. fraksiyon; 9. 57. fraksiyon; 10. 59. fraksiyon. Jel C: 1. 63. fraksiyon; 2. 65. fraksiyon; 3. 67. fraksiyon; 4. moleküler ağırlık belirteci; 5. 69. fraksiyon; 6. 73. fraksiyon; 7. 77. fraksiyon; 8. 81. fraksiyon; 9. 83. fraksiyon; 10. 85. fraksiyon

Kültür üst sıvısı, amonyum sülfat çöktürmesi ve uygulanan kolon kromatografileri sonucunda elde edilen protein miktarı, toplam aktivite ve spesifik aktivite değerleri ile ulaşılan verim ve saflaştırma oranları Tablo 3.1’de sunuldu:

Tablo 3.1. *Bacillus* sp. GYTE-L1 alkalen proteazını saflaştırma tablosu.

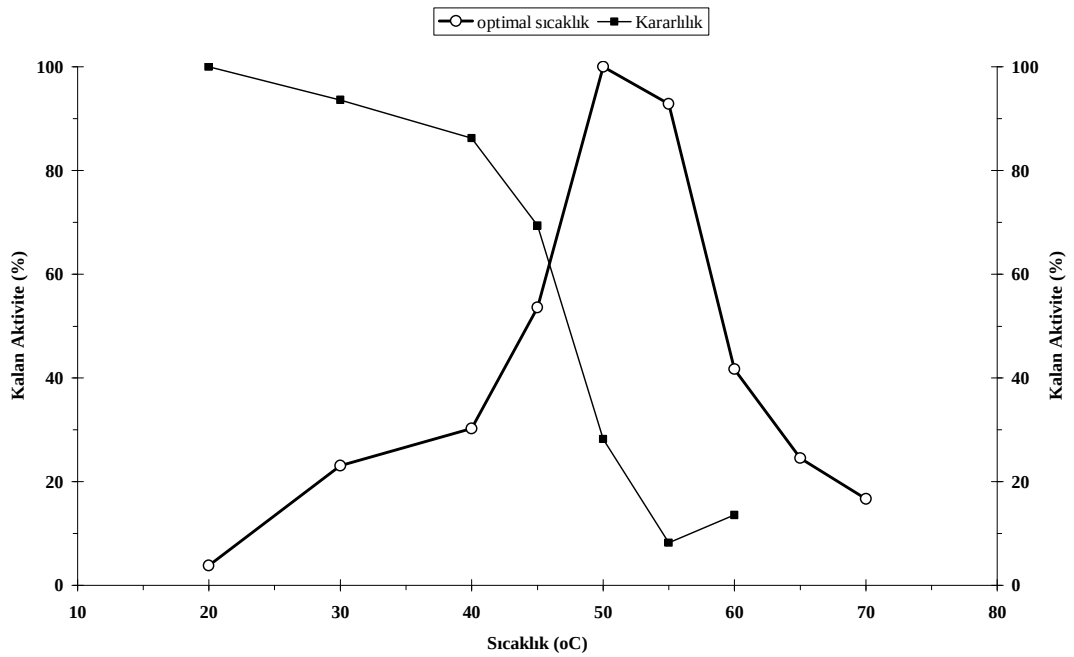
Aşamalar	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (µg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Oranı	Saflaştırma Verimi (%)
Kültür Üst Sıvısı	110849,1	142857	0,78	1	100
% 80 AS çöktürmesi	55955,4	19488	2,87	3,70	50,48
Q-sefaroze	22232,3	1318	16,86	21,73	20,06
Sefakril S100 Havuz 1	57235,6	700	81,80	105,43	51,63

3.2. *Bacillus* sp. GYTE-L1 Alkalen Proteazının Nitelendirilmesi

3.2.1. Optimum Reaksiyon Sıcaklığı ve Sıcaklık Kararlılığı

Alkalen proteazın optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 °C sıcaklıklarda aktivite testi yapıldı. Yapılan bu çalışma sonucunda optimum reaksiyon sıcaklığının 50 °C olduğu belirlendi. Enzim aktivitesinin 20–50 °C değerleri arasında artış gösterdiği, 55 °C'ta, en yüksek aktivitesinin yaklaşık % 95'ini, 60 °C'ta yaklaşık % 40'ını ve 70 °C'ta % 20'sini koruduğu gözlemlendi (Şekil 3.6). Bu çalışmadan sonra yapılan diğer nitelendirme çalışmalarında reaksiyon sıcaklığı olarak 50 °C değeri kullanıldı.

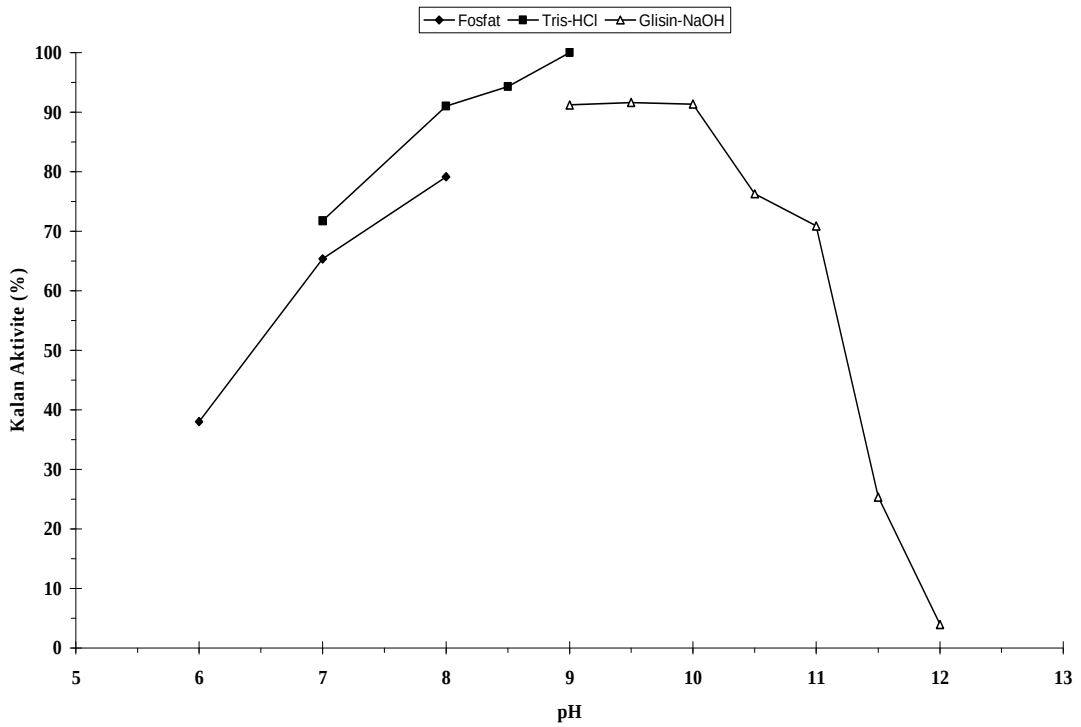
Saflaştırılan alkalen proteazın sıcaklık kararlılığının belirlenmesi amacıyla enzim 15 dakika boyunca 20, 30, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C sıcaklıklarda bekletildikten sonra üzerine substrat tamponu eklenerek aktivite testi yapıldı. 20 °C'ta bekletilen örneğin aktivite değeri % 100 kabul edildi ve enzimin başlangıç aktivitesinin, 40 °C'ta % 82'sini, 45 °C'ta yaklaşık % 65'ini ve 50 °C'ta % 25'ini koruduğu gözlemlendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. *Bacillus* sp. GYTE-L1 alkalen proteazının reaksiyon sıcaklığı ve sıcaklık kararlılığı grafiği.

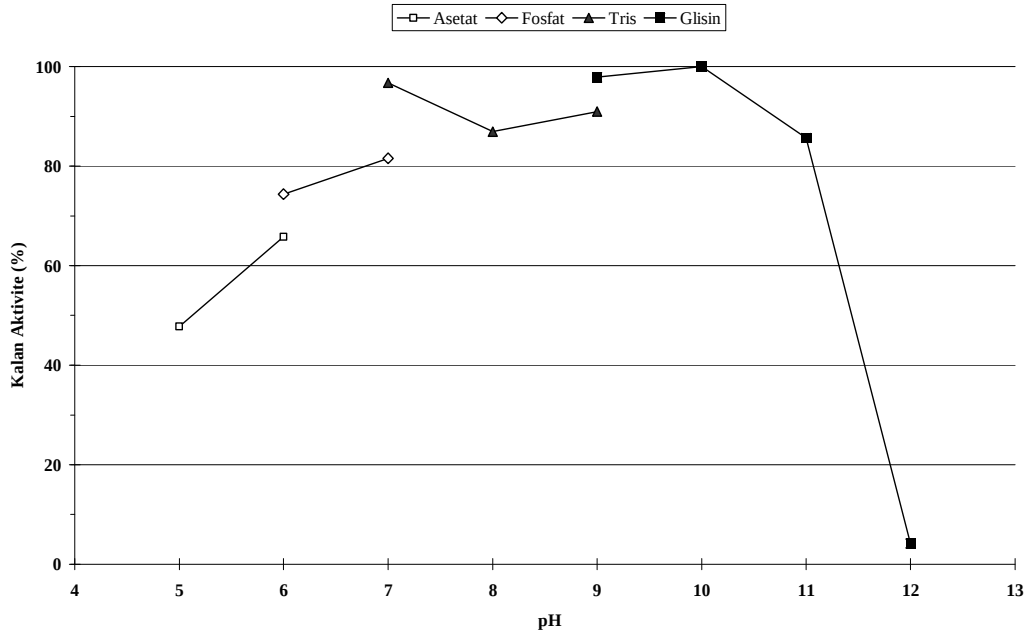
3.2.2. Optimum Reaksiyon pH'sı ve pH Kararlılığı

Bacillus sp. GYTE-L1 alkalen proteazının optimal reaksiyon pH'sının saptanması amacıyla, farklı pH değerleri için farklı tamponlarda hazırlanan ve % 0,6 kazein içeren substrat çözeltilerinin kullanıldığı aktivite testleri gerçekleştirildi. Enzimin pH 6.0, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5 ve 12.0 değerlerindeki aktivitesi belirlenerek, optimal reaksiyon pH'sı 9,0 bulundu. Enzimin pH 7–11 aralığında genel olarak iyi aktivite gösterdiği gözlemlendi. pH grafiği, pH 9.0'daki enzim aktivitesi % 100 kabul edilerek çizildi.



Şekil 3.7. *Bacillus* sp. GYTE-L1 alkalen proteazının pH grafiği.

Enzim farklı pH'lardaki tamponlar içinde 1/100 oranında seyreltilip, +4°C'ta 40 saat boyunca inkübe edildikten sonra kalan aktivite standart koşullarda belirlenerek, pH kararlılık grafiği oluşturuldu (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. *Bacillus* sp. GYTE-L1 alkalin proteazının pH kararlılık grafiği.

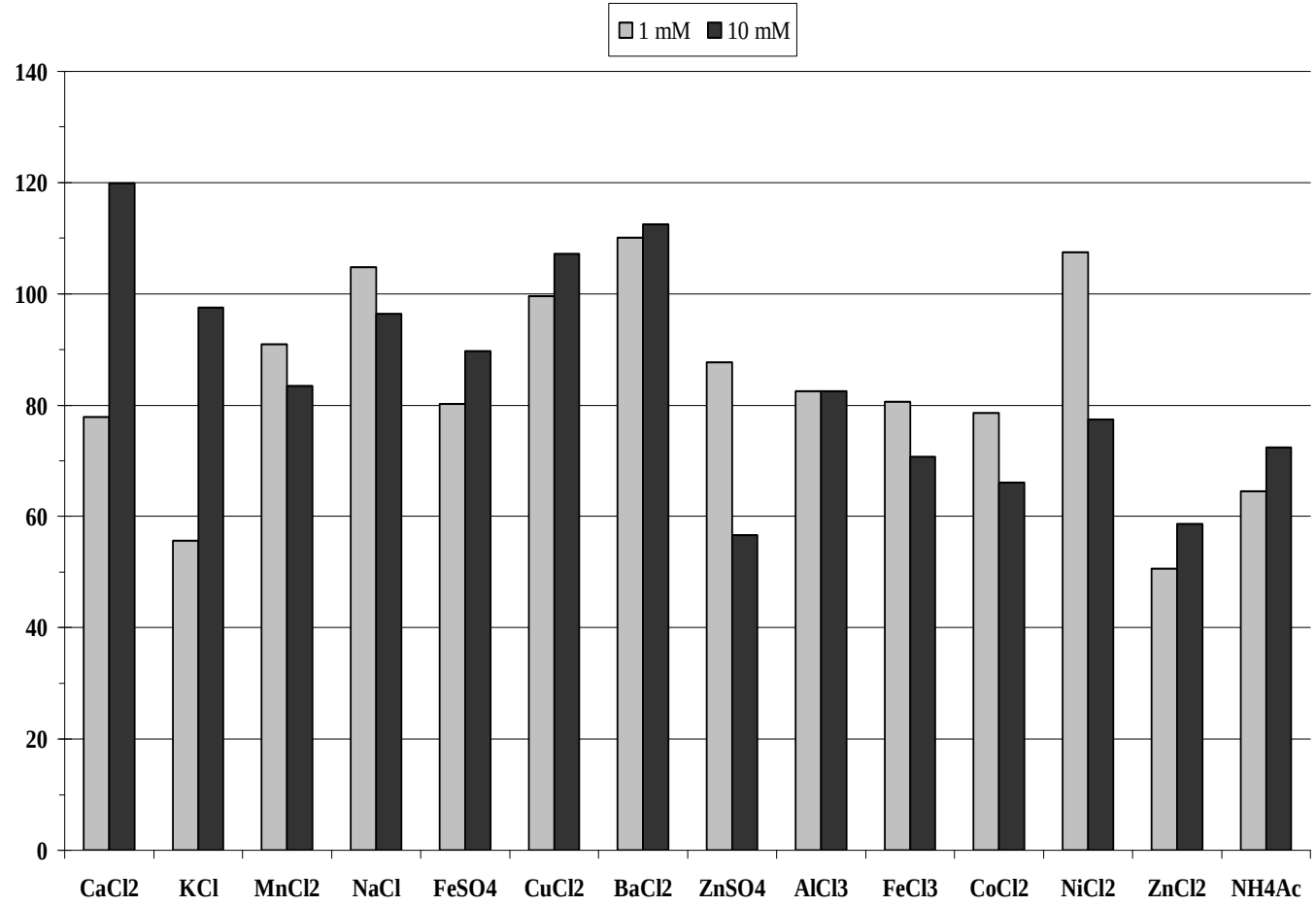
3.2.3. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi

Tek, iki ve üç değerlikli çeşitli iyonların (AlCl_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 , KCl , MgCl_2 , MnCl_2 , NaCl , NiCl_2 , ZnCl_2 , FeSO_4 , ZnSO_4 ve NH_4) alkalin proteaz aktivitesi üzerine etkisi test edildi. Alkalin proteazın verilen tuzlarla yüzleştirilmesinin ardından, aynı koşullarda metal tuzu eklenmeksizin bekletilen ve yalnızca enzim içeren kontrol örneğine göreceli kalan aktivite değerleri (%) hesaplandı. Bu sonuçlar göz önüne alınarak çizilen grafiğin değerlendirilmesi sonucunda inhibitör/aktivatör etki gösteren veya herhangi bir etki göstermeyen metal iyonları belirlendi.

Enzim aktivitesinin, 10 mM CaCl_2 , 1 mM NaCl , 10 mM CuCl_2 , 1 ve 10 mM BaCl_2 , 1 mM NiCl_2 varlığında artışı gözlemlendi. 10 mM K^+ iyonu belirgin bir etki yaratmazken, 1 mM K^+ iyonunun aktiviteyi yaklaşık % 56'ya, benzer şekilde Zn^{2+} 'nin klor tuzunun 1 mM derişimde aktiviteyi % 58'e ve 10 mM derişimde % 59'a düşürdüğü belirlendi. 10 mM ZnSO_4 varlığında aktivitenin % 58'e düştüğü gözlemlendi. Diğer metal iyonları ve NH_4 enzimatik aktivitede değişik oranlarda azalmaya neden oldular.

Tablo 3.2. Çeşitli metal iyonların alkalen proteaz aktivitesi üzerine etkisi

Kullanılan Metal Tuzları	Kalan Aktivite (%)	
	1 mM	10 mM
CaCl ₂	77,9	119,9
KCl	55,6	97,5
MnCl ₂	90,9	83,4
NaCl	104,8	96,4
FeSO ₄	80,2	89,7
CuCl ₂	99,6	107,2
BaCl ₂	110,2	112,5
ZnSO ₄	87,7	56,7
AlCl ₃	82,5	82,5
FeCl ₃	80,6	70,8
CoCl ₂	78,6	66,1
NiCl ₂	107,5	77,4
ZnCl ₂	50,6	58,7
NH ₄ Ac	64,5	72,4



Şekil 3.9. Çeşitli metal iyonların alkalen proteaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.

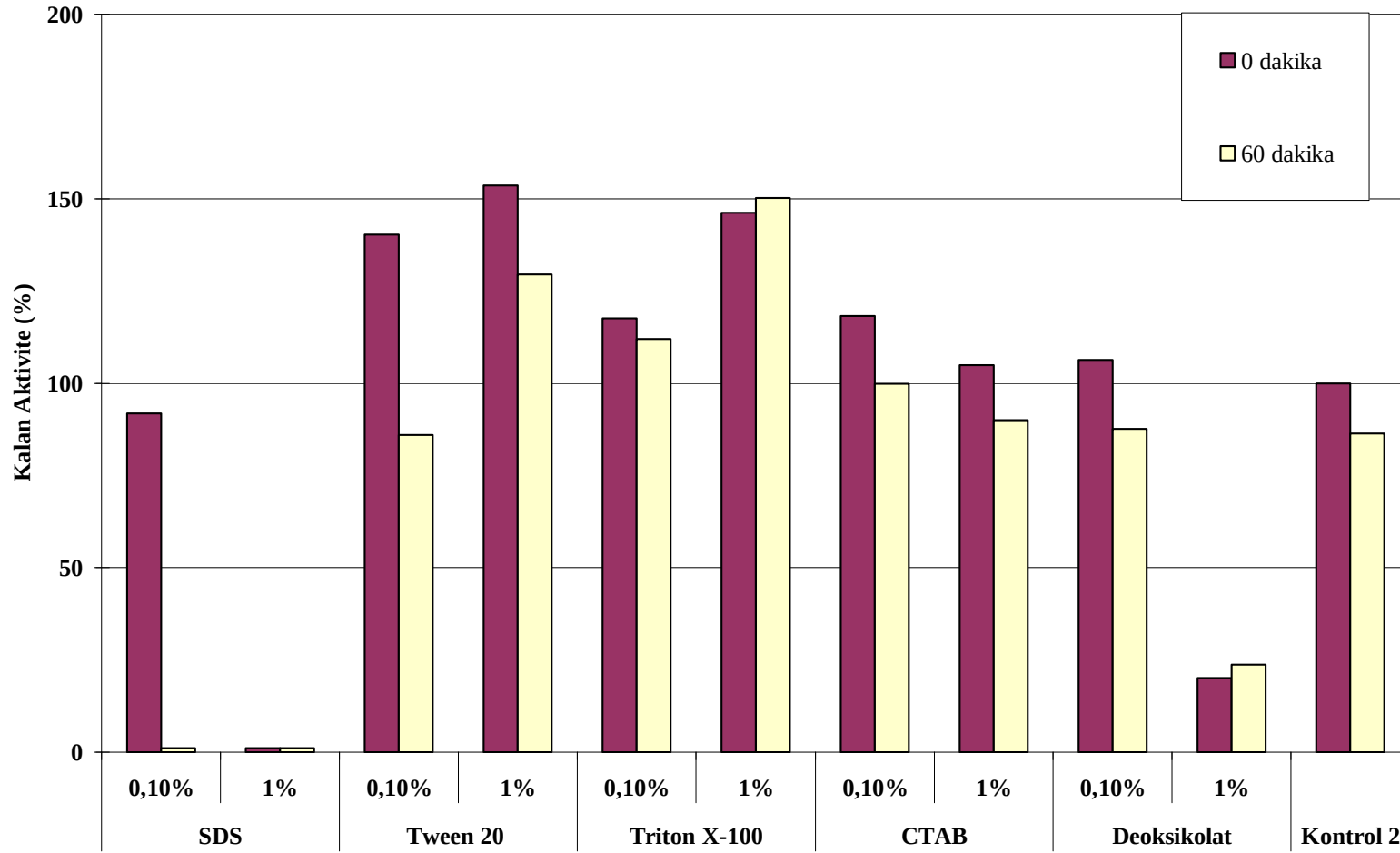
3.2.4. Deterjanların Enzim Aktivitesine Etkisi

Yüzey aktif özelliği bulunan bazı deterjanların enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için % 0.1 ve % 1 deterjan konsantrasyonlarında ve 37 °C sıcaklıkta gerçekleştirilen çalışmada aktivite testleri, deterjan eklendikten hemen ve 60 dakika sonra gerçekleştirildi. Çalışmada iki farklı kontrol kullanılmıştır: *Kontrol 1: + 4 °C'ta korunan, oda sıcaklığına alındıktan 5 dk sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen enzim örneğidir. Kontrol 2: Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 37°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir.* Kalan aktivite hesaplanırken; Kontrol 1 için elde edilen aktivite değeri % 100 kabul edilmiş, diğer örnekler ve Kontrol 2 için kalan aktivite hesaplanmıştır.

Buna göre; % 0.1 SDS'in, eklendikten hemen sonra enzim aktivitesini % 92'ye düşürdüğü, bir saat sonunda aktivitenin bütünüyle kaybolduğu, % 1 derişimde ise aktiviteyi her koşulda durdurduğu gözlemlendi. Tween 20'nin % 0.1 derişimde eklenmesinden hemen sonra aktivitenin % 140'a yükseldiği, ancak 60 dakika sonunda % 86'ya gerilediği, % 1 derişimde ise aktivitenin başlangıçta % 150 ve 60 dk sonra % 129'a yükseldiği gözlemlendi. % 0,1 Triton X-100 varlığında aktivitenin kısmen arttığı, % 1 derişimde ise başlangıçta ve 60. dakikada aktivitenin yaklaşık % 150'ye varan oranlarda yükseldiği belirlendi. CTAB'ın her iki derişiminde de, enzim aktivitesinin özellikle başlangıçta arttığı gözlemlendi. Son olarak % 0,1 deoksikolat varlığında aktivitenin yalnızca başlangıçta hafifçe artmasına karşın, % 1 derişimde hem başlangıçta hem de 60. dakika sonunda belirgin bir inhibisyon saptandı.

Tablo 3.3. Çeşitli deterjanların enzim aktivitesine etkisi. (Kontrol 2: *Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 37°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir*)

Deterjan	%	Kalan Aktivite (%)	
		0 dakika	60 dakika
SDS	0,10	92	1
	1	1	1
Tween 20	0,10	140	86
	1	154	129
Triton X-100	0,10	118	112
	1	146	150
CTAB	0,10	118	100
	1	105	90
Deoksikolat	0,10	106	88
	1	20	24
Kontrol 2		100	86



Şekil 3.10. Çeşitli deterjanların enzim aktivitesi üzerine etkisi. (Kontrol 2: Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 37°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir)

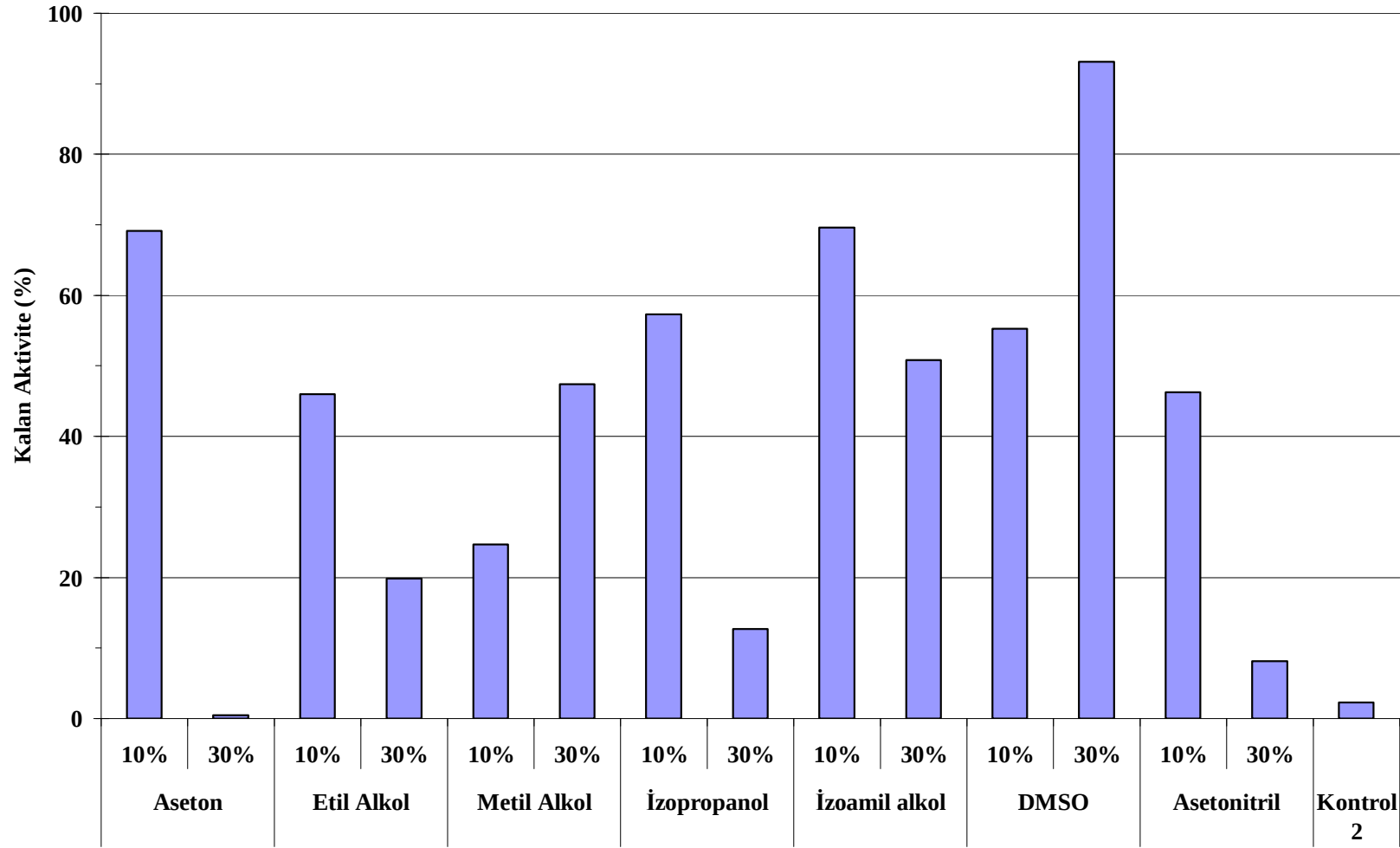
3.2.5. Çeşitli Organik Çözücülerin Enzim Aktivitesine Etkisi

Bazı organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, % 10 ve % 30 oranında organik çözücü varlığında 40 °C sıcaklıkta gerçekleştirilen çalışmada 60 dakika bekletilen örnekler ile yapılan aktivite testi sonuçları, *Kontrol 1* (+ 4 °C'ta korunan, oda sıcaklığına alındıktan 5 dk sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen enzim örneğidir) için alınan aktivite değeri % 100 kabul edilerek, kalan aktivite şeklinde ifade edildi. Çalışmada kullanılan diğer kontrol; *Kontrol 2*: yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 40°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir.

40°C'ta diğer örnekler ile birlikte 60 dk boyunca inkübe edilen enzim örneğinin başlangıçtaki aktivenin ancak % 2.3'ünü koruyabilmesine karşın, % 30 DMSO varlığında % 93.1'ini, % 10 aseton veya izoamilalkol varlığında yaklaşık % 69'unu koruduğu belirlendi. İzopropanol, etanol ve asetonitrilin farklı derişimleri sıcaklık kararlılığını Kontrol 2'ye göreceli olarak 25 keze varan oranlarda iyileştirdiler.

Tablo 3.4. Çeşitli organik çözücülerin enzim aktivitesine etkileri. (Kontrol 2: *Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 40°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir*)

Organik Çözücü	%	Kalan Aktivite (%)
Aseton	10	69,1
	30	0,5
Etil Alkol	10	46,0
	30	19,8
Metil Alkol	10	24,7
	30	47,4
İzopropanol	10	57,3
	30	12,7
İzoamil alkol	10	69,6
	30	50,8
DMSO	10	55,3
	30	93,1
Asetonitril	10	46,3
	30	8,1
Kontrol 2		2,3



Şekil 3.11. Çeşitli organik çözücülerin enzim aktivitesine etkileri. (Kontrol 2: Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 40°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir)

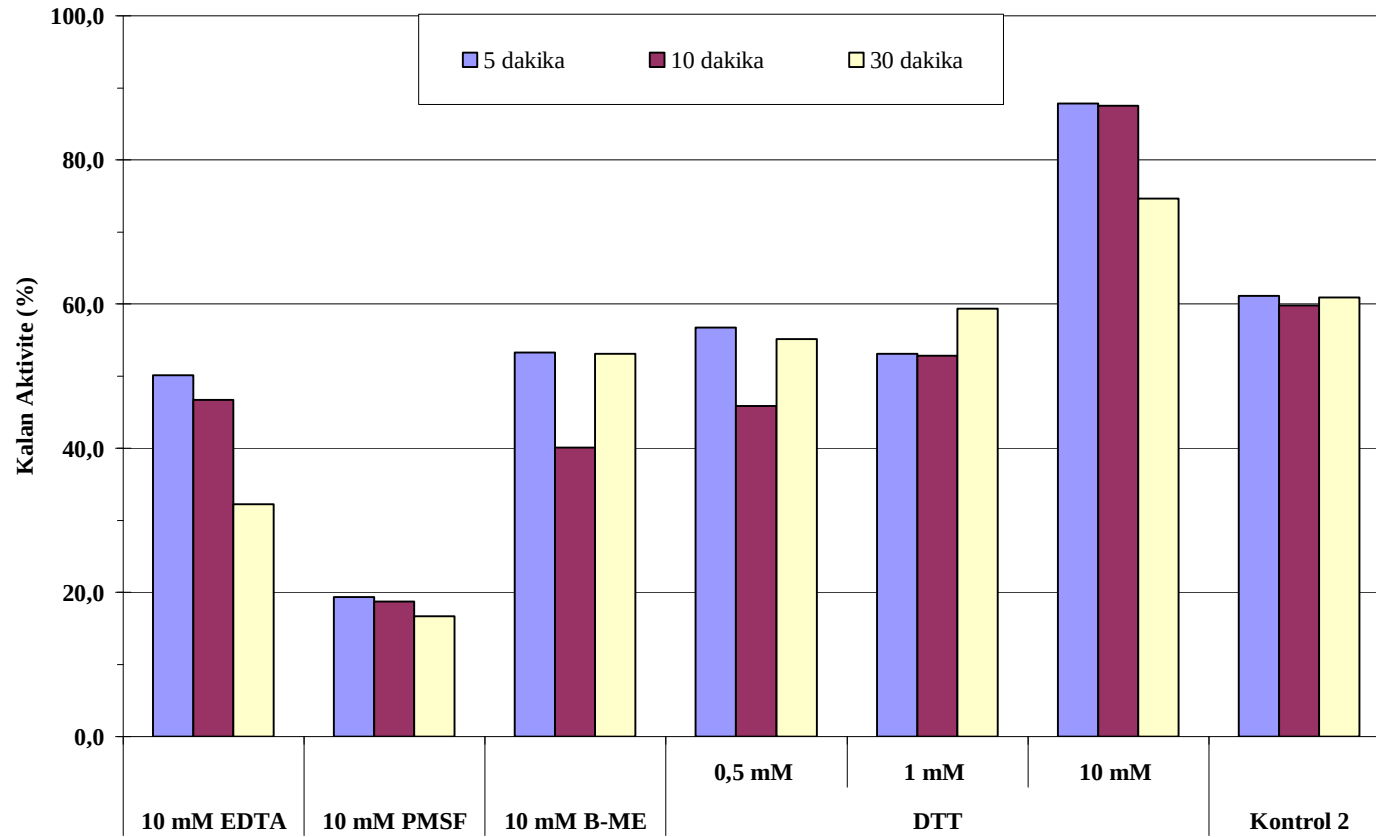
3.2.6. Bazı İnhibitörler ve Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çeşitli kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin irdelenmesi amacıyla EDTA, PMSF, B-ME ve DTT varlığındaki enzim aktivitesi değerlendirildi. 37 °C'ta, 10 mM EDTA, PMSF ve B-ME ve 0,5, 1 ve 10 mM DTT varlığında gerçekleştirilen aktivite testlerinin sonuçları, *Kontrol 1* (+ 4 °C'ta korunan, oda sıcaklığına alındıktan 5 dk sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen enzim örneğidir) için elde edilen değer % 100 kabul edilerek, kalan aktivite değerleri şeklinde hesaplandı ve Tablo 3.6'da gösterildi. Çalışmada kullanılan diğer kontrol; *Kontrol 2*: yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 37°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir.

10 mM EDTA varlığında 30. dakikada, enzimin başlangıçtaki aktivitesinin ancak % 32,22'sini koruyabildiği, 10 mM PMSF varlığında % 80'e yakın oranda inhibe olduğu, 10 mM BME ile başlangıç aktivitesinin yarısından fazlasını koruduğu ve 10 mM DTT için bu değer yaklaşık % 88'e ulaşabildiği gözlemlendi. Diğer örnekler ile birlikte 37°C'ta 60 dk süreyle imküne edilen *Kontrol 2*, enzimin başlangıçtaki aktivitesinin (*Kontrol1*) yaklaşık % 61'ini korudu.

Tablo 3.5. Bazı inhibitörler ve kimyasalların enzim aktivitesine etkileri. (*Kontrol 2: Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 37°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir*)

Kimyasal Madde		Kalan Aktivite (%)		
		5 dak	10 dak	30 dak
10 mM EDTA		50,07	46,73	32,22
10 mM PMSF		19,3	18,72	16,69
10 mM B-ME		53,27	40,06	53,12
DTT	0,5 mM	56,75	45,86	55,15
	1 mM	53,12	52,83	59,36
	10 mM	87,81	87,52	74,6
Kontrol 2		61,1	59,8	60,96



Şekil 3.12. Bazı inhibitörler ve kimyasalların enzim aktivitesine etkisi. (Kontrol 2: *Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 37°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir*)

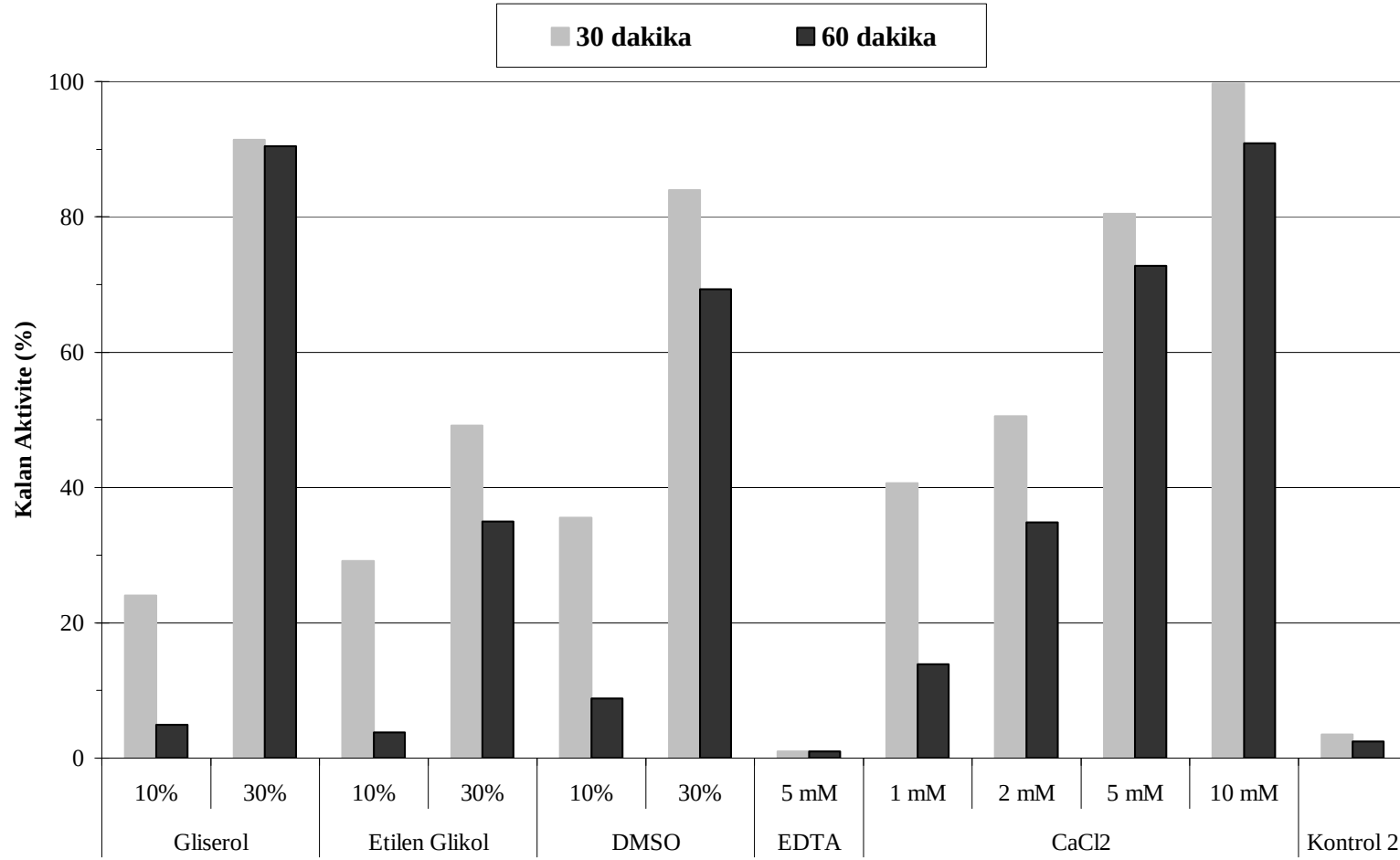
3.2.7. Çeşitli Maddelerin Enzim Aktivitesi/Sıcaklık Kararlılığı Üzerine Etkisi

Bazı efektör maddelerin enzimin sıcaklık kararlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla gliserol, etilen glikol, DMSO, EDTA ve CaCl_2 'ün kullanıldığı bir çalışma gerçekleştirildi. Bu efektör maddelerin farklı derişimleri ile 50°C 'ta 30 ve 60 dakika inkübe edilen örnekler standart aktivite testine alındı. Çalışmada iki farklı kontrol kullanıldı: *Kontrol 1: + 4°C 'ta korunan, oda sıcaklığına alındıktan 5 dk sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen enzim örneğidir. Kontrol 2: Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 50°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir.* Kalan aktivite hesaplanırken; Kontrol 1 için elde edilen aktivite değeri % 100 kabul edilmiş, diğer örnekler ve Kontrol 2 için kalan aktivite hesaplanmıştır.

CaCl_2 ile 1, 2, 5 ve 10 mM konsantrasyonda gerçekleştirilen testlerde enzim kararlılığının konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak arttığı belirlendi. 10 mM CaCl_2 varlığında, enzimin başlangıçtaki aktivitesini 50°C 'ta 60 dk boyunca % 90.9 oranında, ilk 30 dk da ise yaklaşık % 100 oranında koruduğu gözlenmiştir. 5 mM CaCl_2 varlığında korunma oranı ilk 30 dakikada % 80 ve 60. dakikada % 73'tür. Enzim % 30 oranında etilen glikol içeren ortamda aktivitesini ilk 30 dakikada % 48 oranında korurken, % 30 DMSO ve gliserol ile aynı sürede % 90'a varan oranlarda kararlı kalmıştır. 5 mM EDTA varlığında aktivite % 1'e düşmüştür.

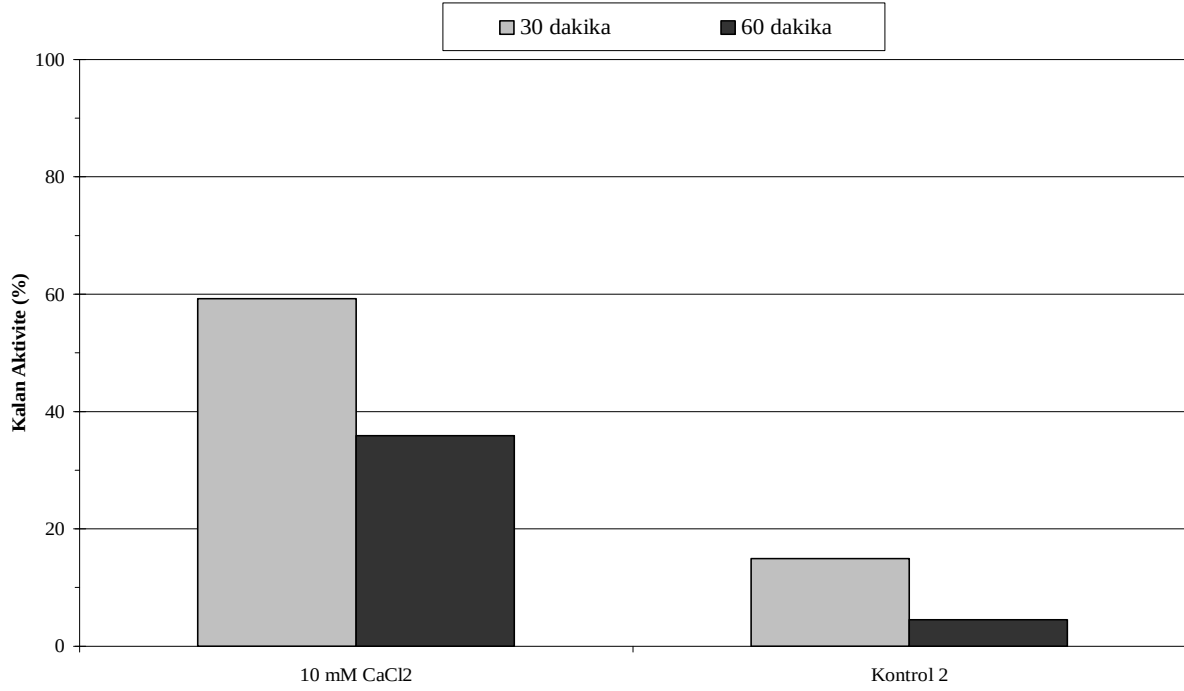
Tablo 3.6. Çeşitli maddelerin enzimin sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi
(Kontrol 2: Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 50°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir)

Madde	Konsantrasyon	Kalan Aktivite (%)	
		30 dakika	60 dakika
Gliserol	% 10	24,1	4,9
	% 30	91,4	90,5
Etilen Glikol	% 10	29,2	3,8
	% 30	49,2	35,0
DMSO	% 10	35,5	8,9
	% 30	84,0	69,3
EDTA	5 mM	1,0	1,0
CaCl ₂	1 mM	40,6	13,9
	2 mM	50,5	34,9
	5 mM	80,5	72,8
	10 mM	99,7	90,9
Kontrol 2		3,5	2,5



Şekil 3.13. Çeşitli maddelerin enzimin sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi. (Kontrol 2: Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 50°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir)

Şekil 3.13’de verilen sonuçlar gözetilerek, 10 mM CaCl_2 ’ün 60 °C’ta enzim kararlılığı üzerine etkisi ayrıca değerlendirildi. Buna göre enzimin 10 mM CaCl_2 varlığında ilk 30 dk sonunda başlangıçtaki aktivitesinin % 59,25’ini ve 60 dakika sonunda % 39,9’unu koruduğu gözlemlendi. Buna karşın yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile 60 °C’ta bekletilen *Kontrol 2* için kalan aktivite, 30 dakika sonunda % 14.9 ve 60. dakikada % 4.5 bulundu.

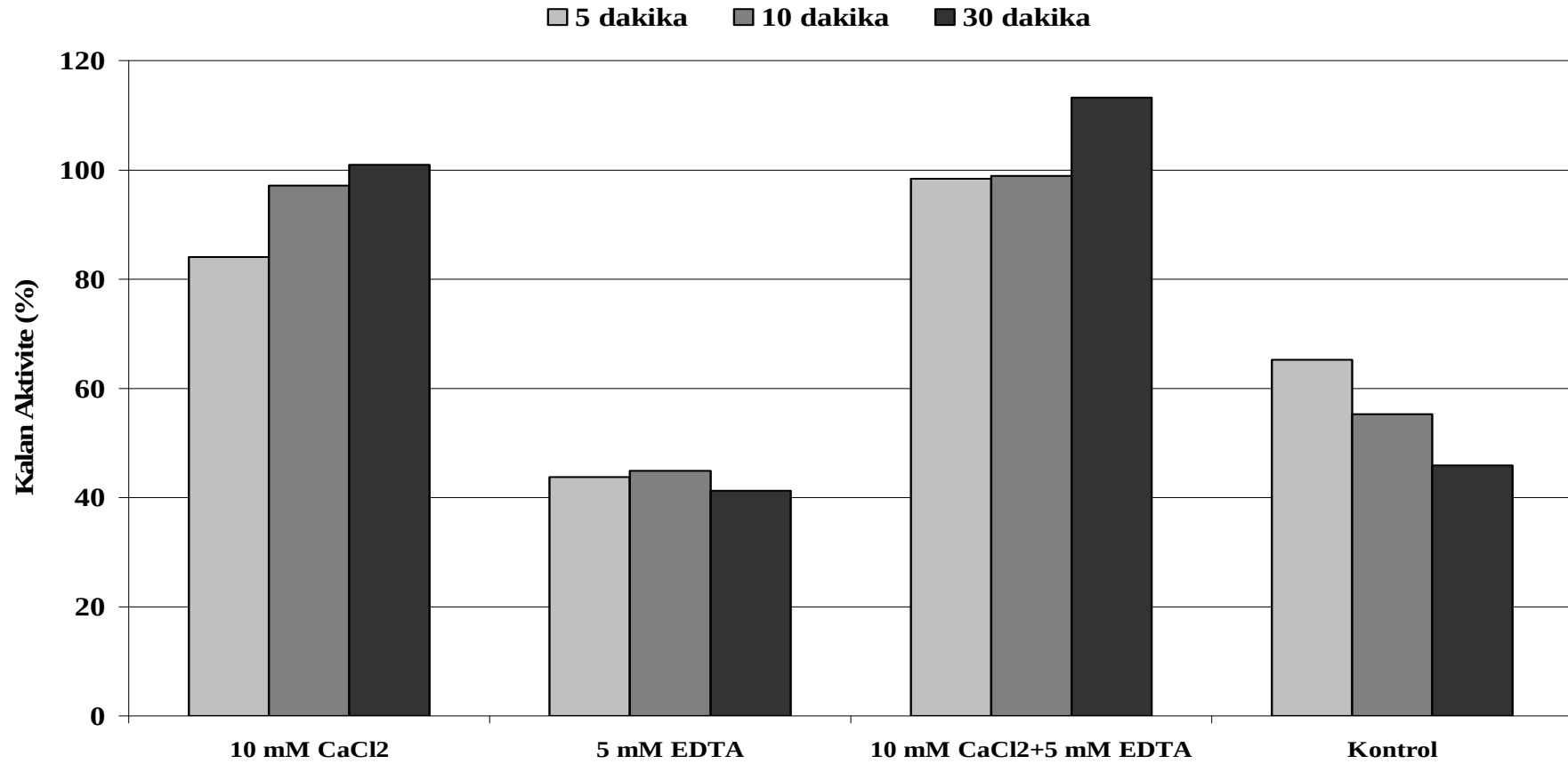


Şekil 3.14. CaCl_2 ’ün 60 °C’ta enzimin sıcaklık kararlılığı üzerine etkisi (Kontrol 2: Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 60°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir).

10 mM EDTA'nın enzim aktivitesini 37 °C'ta büyük oranda inhibe ettiği, buna karşın 10 mM CaCl₂ varlığında aktivitenin 50 ve 60 °C'ta büyük oranda korunduğu gözetilerek 5 mM EDTA'nın 10 mM CaCl₂ varlığındaki etkisi 37 °C ve 60 °C'ta ayrı ayrı irdelendi. Buna göre; 5 mM EDTA ve 10 mM CaCl₂ varlığında 37 °C'ta, 5 ve 10. dakika sonunda başlangıçtaki aktivitenin (Kontrol 1) yaklaşık % 99 oranında korunduğu, 30 dakika sonunda ise kalan aktivitenin yaklaşık % 113 olduğu belirlendi.

Tablo 3.7. 10 mM CaCl₂ve 5mM EDTA varlığında enzim aktivitesi (Kontrol 2: *Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 37°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir*)

Kullanılan Madde	Kalan Aktivite (%)		
	5 dak	10 dak	30 dak
10 mM CaCl₂	84,07	97,15	100,91
5 mM EDTA	43,73	44,88	41,25
10 mM CaCl₂+5 mM EDTA	98,43	98,91	113,26
Kontrol 2	65,23	55,24	45,85

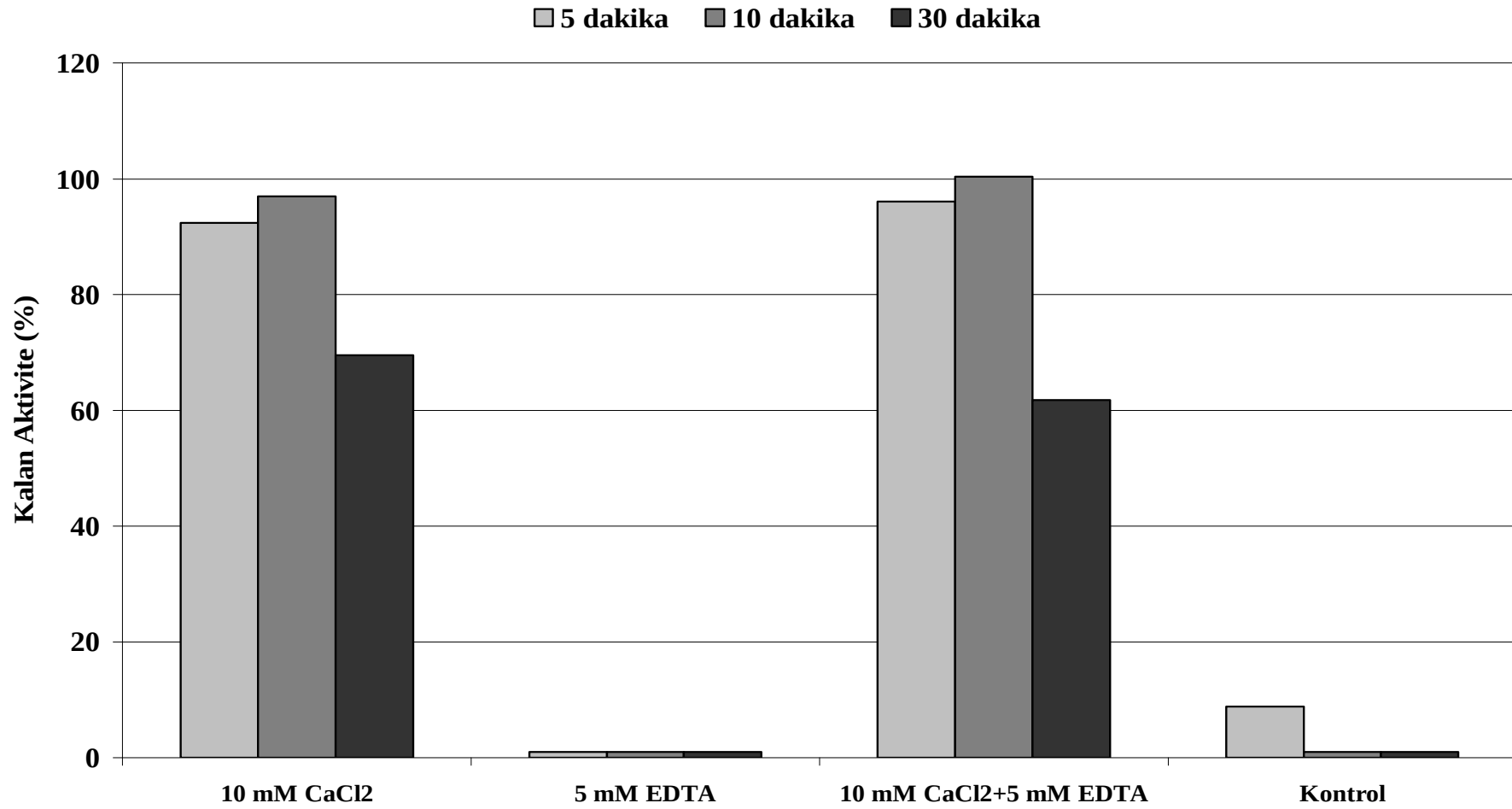


Şekil 3.15. 10 mM CaCl₂ ve 5 mM EDTA varlığında 37°C'ta enzim kararlılığı. (Kontrol 2: Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 37°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir)

Aynı çalışmanın 60 °C'ta gerçekleştirildiği kararlılık testinde, yalnızca 5 mM EDTA varlığında aktivitesinin tamamını kaybeden enzimin, 10 mM CaCl₂+5 mM EDTA varlığında 5, 10 ve 30 dakika sonundaki kalan aktivite değerleri sırasıyla % 96, % 100 ve % 62 bulundu.

Tablo 3.8. 60°C'ta 10 mM CaCl₂ ve 5 mM EDTA varlığında enzim kararlılığı (Kontrol 2: Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 60°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir)

Kullanılan Madde	Kalan Aktivite (%)		
	5 dak	10 dak	30 dak
10 mM CaCl₂	92,33	96,96	69,56
5 mM EDTA	0	0	0
10 mM CaCl₂+5 mM EDTA	96,05	100,34	61,78
Kontrol 2	8,79	0	0

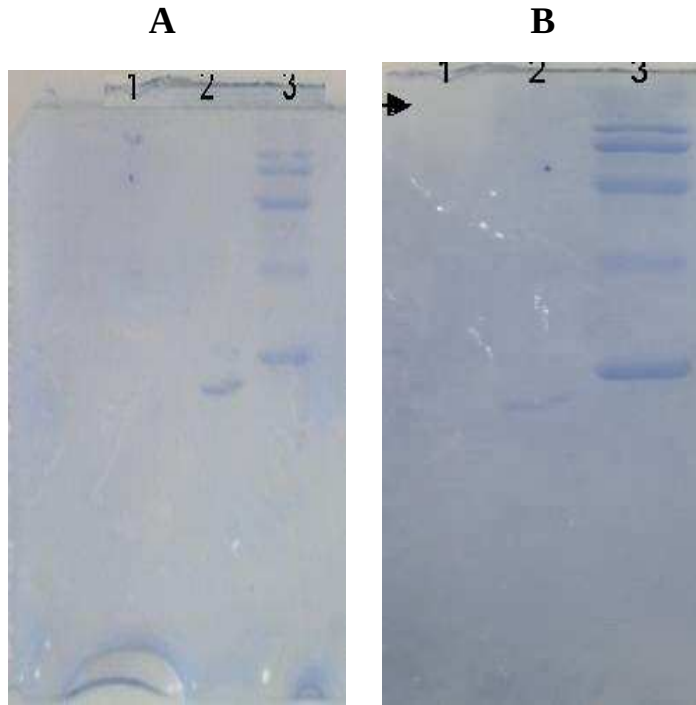


Şekil 3.16. 10 mM CaCl₂+5 mM EDTA varlığında 60°C'ta enzim enzim kararlılığı. (Kontrol 2: Yalnızca enzim içeren ve diğer örnekler ile birlikte 60°C sıcaklıkta belirtilen sürelerde bekletildikten sonra aktivitesi standart yöntemle belirlenen örnektir)

3.3. Zimogram Analizi Sonuçları

Saflaştırılan enzimin moleküler büyüklüğü, SDS/PAGE analizinde kullanılan moleküler belirteçte yer alan karbonik anhidraza (29 kDa) göreceli olarak 27-28 kDa tahmin edildi (Şekil 3.14.A). Buna karşın kısmen saflaştırılan enzim denatüre edici olmayan (nativ) PAGE analizinde jele girmede.

Bacillus sp. GYTE-L1 alkalin proteazı ile yapılan, jelatin içeren ve SDS-PAGE ile eş zamanlı yürütülen zimogram jeli Şekil 3.14.B’de verildi. Zimogramda proteolitik aktivite sonucu oluşan açık renkli zon jelin üst kenarına yakın bir bölgede gözlemlendi.



Şekil 3.17. *Bacillus* sp. GYTE-L1 alkalin proteazı SDS-PAGE ve zimogram analizi. Jel A: SDS-PAGE Analizi: Kuyu 1. Native PAGE dye ile yüklenmiş havuz 1, Kuyu 2. “Cracking” tampon ile yüklenmiş havuz 1, Kuyu 3. Moleküler ağırlık belirteçleri (karbonik anhidraz: 29, ovalbumin: 45, Bovin Serum Albumin: 66, Fosforilaz b: 97.4, β -galaktosidaz: 116, miyozin: 205 kDa), Jel B: Zimogram analizi: Kuyu 1. Native PAGE dye ile yüklenmiş havuz 1, Kuyu 2. “Cracking” tampon ile yüklenmiş havuz 1, Kuyu 3. Moleküler ağırlık belirteçleri (karbonik anhidraz: 29, ovalbumin: 45, Bovin Serum Albumin: 66, Fosforilaz b: 97.4, β -galaktosidaz: 116, miyozin: 205 kDa).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alkalen proteazlar serin proteazların (E.C. 3.4.21) alt tipi olan bir enzim grubudur. Çeşitli proteazların katalitik mekanizmaları arasında farklılıklar olmasına karşın, bu gruptaki enzimler aynı kimyasal reaksiyonu, yani proteinlerin yapısında bulunan peptit bağının hidrolizini katalize ederler (Nduwimana ve ark., 1995; Horikoshi ve ark., 1999; Maurer, 2004).

Alkalen proteazlar deterjan endüstrisinde, gıda endüstrisinde süt ürünlerinin oluşturulması ve besinlerin tatlandırılmasında, dericilikte kılların uzaklaştırılması ve daha pürüzsüz deri yüzeyinin elde edilmesinde ve fotoğrafçılıkta filmlerin üzerinde bulunan gümüşün geri kazanılmasında kullanılmaktadır (Singh ve ark., 1999). Ayrıca ilaç sanayi, fırıncılık, yakıt, hayvan yemi imalatı, meşrubat, tekstil, kağıt, tanı ve kimya endüstrilerinde de kullanım alanına sahiptirler (Rao ve ark., 1998; Kumar ve ark., 1999; Kirk ve ark., 2002).

Alkalen proteazlar bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kökenli kaynaklardan elde edilebilirler. Ancak endüstriyel kullanım için mikrobiyal kökenli proteazlar tercih edilmektedir. Bunun temel nedenleri; kolay, hızlı ve ekonomik olarak üretilmeleri, geniş pH aralığında ve farklı sıcaklık değerlerinde reaksiyon gösterebilmeleridir (Nduvimana ve ark., 1995; Siezen ve Leunissen, 1996).

Alkalen proteazlar deterjanlara, su, kir, kan lekelerindeki protein kökenli kısımların çıkarılmasını kolaylaştırmak üzere eklenir. Bazı deterjanlar klorin beyazlatıcılar içerir ve klorinlerin enzimleri inaktive etmesini engellemek üzere (özellikle alkalen koşullarda) deterjan bileşimlerine enzimi kararlı kılacak bir sistemin parçası olarak katılırlar. Proteaz/klorin uyumsuzluğu, enzimin gıda işleme endüstrisinde temizlik ajanlarının bir parçası olarak yaygın şekilde kullanılamayışının başlıca nedenlerinden birisidir ve yeni alkalen proteazların araştırılmasının gerekçelerinden birisini oluşturur (Singh ve ark., 2001)

Son yıllarda ultrafiltrasyon ve ters ozmoz gibi membran prosesleri atık işleme, süt ve meşrubat endüstrilerinde büyük bir önem kazanmıştır. Bu süreçleri sınırlayan

temel faktörler; akış hızında membran tıkanmalarına bağlı azalma ve membran temizliğinin maliyeti arttırmasıdır. Enzim temelli bir basamak ile birlikte veya enzim kullanılmaksızın asit ve alkali ile muamele; geleneksel temizlik uygulamalarında kullanılan ana basamaklardır. Kullanılan enzimler daha çok mezofilik organizmalardan izole edilmekte, dar bir pH aralığında, ılımlı sıcaklıklarda çalışmakta ve deterjanlara karşı toleransları sınırlı olmaktadır. Buna karşın alkalin proteazlar yüksek pH ve sıcaklıklarda, sürfaktanlar ve kaotrofik ajanların varlığında optimal aktivite göstermekte, bu özellikleri onları endüstriyel uygulamalar için elverişli kılmaktadır. Kumar (2002) tarafından izole edilen *B. pumilus* MK6-5'in sıcaklık kararlılığı gösteren alkalin proteazı, geniş pH ve sıcaklık aralıklarında çalışabilme yeterliliği ve deterjanlara toleransına bağlı olarak, bu bağlamda sınırlayıcı nitelikler taşıyan mezofilik proteazlara benzemeyen ve bu nedenle de ultrafiltrasyon membran temizliği için çok yararlı olabilecek bir enzimdir (Kumar, 2002).

Proteazların peptit sentezinde ve protein işlenmesinde kullanılmasının çok sayıda avantajı vardır. Ancak bu yaklaşım, organik çözücü varlığında kararlı olan proteazların hazırlanmasını gerektirir. Proteazlar genel olarak akışkan olmayan ortamlarda çok düşük hızda reaksiyon verirler veya inaktive olurlar. Bu nedenle çözücüye dirençli proteazların araştırılması güncel bir çalışma alanıdır. Enzimleri organik çözücülerin varlığında kararlı kılmak üzere, kimyasal modifikasyon, immobilizasyon, protein mühendisliği ve yönlendirilmiş evrim gibi çeşitli fiziksel, kimyasal yöntemler ve rekombinant DNA teknikleri kullanılır. Son yıllarda organik çözücülere toleran bazı mikroorganizmalar rapor edilmiş ve bu organizmaların enzimlerinin çözücülerden yana zengin ortamlarda çalıştığı saptanmıştır. Çözücü kararlılığı gösteren proteazlar çözücülere toleran *Pseudomonas* ve *Bacillus* türlerinden izole edilmiştir (Gupta ve ark., 2005). Çözücülere dirençli *P. aeruginosa* PseA soyu topraktan izole edilmiş ve geniş bir organik çözücü grubu içinde aktif olan yeni bir alkalin proteaz salgıladığı belirlenmiştir (Gupta ve ark., 2005).

Farklı *Bacillus* türleri tarafından üretilen proteazların yalnızca tipleri değil, pH ve sıcaklık optimumları da farklılık gösterir. Ayrıca yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde işlev görme yeterlilikleri de farklıdır. Ancak, sıcaklık kararlılığı olan enzimlerin özellikle sıcak sever mikroorganizmalar tarafından üretileceğine ilişkin

mutlak bir bulgu yoktur. Buna karşın sıcak sever bakterilerin sıcaklık kararlılığı olan proteinler üretme şansı daha büyüktür. *Bacillus* türlerinden izole edilen çok sayıda sıcaklığa dayanıklı proteaz rapor edilmiştir. Proteazlar fizikokimyasal ve katalitik özellikler yönünden de geniş bir çeşitlilik gösteren yüksek derecede karmaşık bir enzim grubudur (Kaur ve ark., 2001).

Bu tez çalışmasında Gönen Dağ Ilıcası'ndan izole edilmiş yerel *Bacillus sp.* GYTE-L1 soyu, alkalen proteaz enzimini elde etmek üzere, biyolojik kaynak olarak kullanılmıştır.

Bacillus sp. GYTE-L1 soyunun alkalen proteaz üretkenliğinin hücre büyümesi ile birlikte değerlendirildiği ilk denemelerde, enzimatik aktivite logaritmik fazın sonlarına değin hücre büyümesi ile paralellik göstermiş, en yüksek aktivite (450 U/ml) kültürün 72. saatinde, durağan fazın başlarında ortaya çıkmış ve yaklaşık 120. saate kadar bu düzeylerde devam ettikten sonra, 216. saatte yaklaşık 230 U/ml düzeylerine inmiştir (Battal, M, 2004).

Bu tez projesi kapsamında *Bacillus sp.* GYTE- L1 soyunda hücre büyümesi ve alkalen proteaz üretiminin yeniden değerlendirilmesi amacıyla yapılan çalışmada, GYTE-L1 soyunun önceden hazırlanmış -20 °C stok kültürü, LB Broth besiyerinin aşılmasında kullanıldı. 1/100 oranında aşılana ön kültür 37 °C'ta 170 rpm'de çalkalanarak gece boyu inkübe edildi.

Ana kültür çalışmasında, % 1 jelatin içeren Nutrient Broth besi yeri, gece boyu büyütülen ön kültür ile 1/100 oranında aşılandı ve 37 °C'ta 170 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. Kültür süresince belirli aralıklarla alınan örneklerde hücre büyümesi (OD₆₀₀) ve aktivite (OD₆₆₀) tayini yapıldı. Bu çalışma ile kültürde en iyi hücre büyümesi ve enzim aktivitesi değerlerinin alındığı zaman aralığı belirlendi. Hücre büyümesi ve enzim üretimi yönünden en uygun zamanın kültürün 64. saati olduğu sonucuna varıldı ve saflaştırma çalışmaları için enzim üretiminin yapıldığı kültürler 64. saatte toplandı (Şekil 3.1). Alkalen proteazın *Bacillus sp.* GYTE-L1 hücreleri tarafından en yüksek düzeyde üretildiği evre daha önce yapılan optimizasyon çalışmalarında (Battal, 2004) gözlenene yakın olmakla birlikte, gerek hücre büyümesi gerekse enzim sentezinin ilk denemelerdeki düzeye ulaşmadığı gözlemlendi.

Aynı zamanda lipaz üreticisi olan GYTE-L1 soyu, alkalen proteazdan farklı olarak bu enzimi hücre büyümesinin erken evresinde ve yaklaşık 10 saat boyunca etkin şekilde üretmektedir.

Alkalen proteaz sentezi konstitütif olmayıp, enzim farklı karbon ve azot kaynaklarının varlığında farklı düzeylerde üretilmektedir. Ferrero ve ark. (1996) 60°C'ta ve pH, 9.0'a kadarki pH değerlerinde büyüme yeteneğinde olan *B. licheniformis* MIR29 ile yaptıkları çalışma sonucunda, kazeinin enzim sentezini uyardığını, ayrıca kültür üst sıvısının amino asit ve peptitlerden (10 kDA'dan küçük moleküller) arındırılmadığı koşullarda aktivitenin azaldığını gözeterek, enzim üretiminin son ürün inhibisyonu ile düzenlenebileceğini önermişlerdir. Hücre büyümesi sırasında denenen nitrojen kaynaklarından üre, enzim üretimini baskılamış, buna karşın proteaz sentezi düşük miktarda amonyum varlığında etkinleşmiştir. (Ferrero ve ark., 1996).

Literatürde zorunlu alkalofilik *Bacillus* soyu P-2'den izole edilen ve sıcaklık kararlılığı gösteren alkalen proteaz, bu soy tarafından % 1 glukoz ile % 0.25 pepton ve maya özütü içeren besi yerinde en etkin şekilde üretilmiştir. Kültür ortamına inorganik nitrojen kaynaklarının eklendiği koşullarda proteaz üretimi % 90'a varan düzeylerde baskılanmıştır (Kaur ve ark., 2001).

Alkalen proteaz üretimi besi yerinde hızla metabolize edilebilen nitrojen kaynakları (amino asitler veya amonyum gibi) tarafından baskılanır. Küçük şekerler ve mineraller gibi diğer besi yeri bileşenleri de sentezlenen enzim miktarını etkiler. Zorunlu alkalofilik olan *Bacillus* P-2 soyu pH, 7.5'in altındaki değerlerde büyümezken, 30°C'ta optimal olmak üzere 15-45°C aralığında büyümüştür. Bu çalışmada besi yeri olarak 5g/l pepton, 1.5 g/l sığır özütü, 5 g/l NaCl ve 1.5 g/l maya özütü kullanılmıştır. Gece boyu büyütülen ön kültür ile 1/100 oranında aşılana 50 ml besi yeri, 250 ml erleninde içinde durağan koşullarda 30°C'ta gece boyu büyütülmüştür. 12000 g'de 20 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen üst sıvı enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Besi yerinde inorganik azot kaynaklarının (NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄ ve üre) bulunması enzim üretimini azaltmıştır (Kaur ve ark., 2001).

Banerjee ve ark., (1999) alkalofilik *B. brevis*'den alkalen proteaz üretimini optimize etmek üzere farklı pH ve sıcaklıkları denemişlerdir. 37 ve 50°C sıcaklıklar ile pH, 9.0-11.0 aralığı bu amaçla test edilmiştir. Gece boyu büyütülen *B. brevis* hücreleri ile aşılana 100 ml ana kültür 500 ml flask içinde 200 rpm'de 37°C'ta 96 saat büyütülmüştür. Hücreler santrifüj ile ayrıldıktan sonra üst sıvının içerdiği hücre dışı proteaz enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. 60°C'ta ve pH, 9.0'a kadar olan pH değerlerinde büyüme yeteneğinde olan *B. licheniformis* MIR29 proteazları üretmek üzere başta laktoz olmak üzere glukoz ve süktroz gibi farklı karbon kaynaklarını kullanmakla birlikte, sıcaklık kararlılığı gösteren proteazın etkin üretimi için kazeinin en iyi karbon kaynağı olduğu belirlenmiştir (Ferrero ve ark., 1996).

GYTE-L1 soyunun proteaz aktivitesinde daha önceki denemelere (Battal, 2004) göreceli azalmanın başlıca nedeninin, besi yerindeki jelatin miktarının % 4'den % 1'e indirilmesi olduğu sonucuna varılmıştır. Besi yeri üst sıvısındaki yüksek jelatin miktarı, saflaştırma basamaklarında, özellikle de amonyum sülfat peletinin çözülmesi aşamasında ve yapılan diyaliz işlemlerine rağmen örneğin yüklendiği ilk kolon materyalinde hasara yol açarak sorun yarattığı için besi yerine eklenen jelatin miktarı % 1'e çekilmiştir. GYTE-L1 proteazı ile sıvı kültürde jelatin varlığında ulaşılan enzim üretkenliği kazeine göreceli daha yüksek olduğu ve enzim üretimi jelatin miktarından etkilendiği için, enzim üretiminin jelatin ile uyarıldığı sonucuna varılmıştır.

Tez çalışması kapsamında *Bacillus* sp. GYTE-L1 alkalen proteazını saflaştırma sürecinde, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerinin ardından çapraz bağlı agaroz birimleri ve fonksiyonel grup olarak da kuaterner amonyum ($-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) içeren Q-sefaroze anyon değişim kromatografisi uygulanmıştır. Q-sefaroze kolonundan elde edilen fraksiyonlarda SDS-PAGE analizleri yapılarak, alkalen proteazın aktivitesinin ve diğer proteinlere göreceli miktarının daha yüksek olduğu fraksiyonlar seçilmiştir. Q-sefaroze iyon değişim kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar arasından 16-32. fraksiyonlar, enzim içeriği ve aktivitesi yönünden zengin bulunmuştur. Q-sefaroze kromatografisi sonunda alkalen proteaz spesifik aktivitesinin yaklaşık 8 kat arttığı gözlenmiştir. Seçilen fraksiyonların toplanması ile oluşturulan havuz, ön işlemlerin ardından Sefakril S-100 kolonuna yüklenmiştir. Allil dekstran / N,N'- metilenbisakrilamid birimlerinin çapraz

bağlanması ile elde edilen Sefakril S-100'den elde edilen aktif fraksiyonlardan 4 ayrı havuz oluşturulmuştur. Bu havuzlar arasında alkalen proteaz içeriği daha zengin ve aktivitesi daha yüksek olan havuz 1 (37–45. fraksiyonlar) daha sonraki işlemlerde enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Havuz 1'de yapılan aktivite testi ve Bradford analizi sonuçları, enzimin kolon öncesi örneğe göreceli 5-6 kez saflaştığını göstermiştir. Coomassie Blue G-250 boyasının kullanıldığı Bradford yöntemi, hızlı ve doğru sonuçlar vermesinden dolayı protein miktar tayininde en çok tercih edilen yöntemler arasındadır (Scopes, 1994). Saflaştırma sürecinin sonunda enzimin spesifik aktivitesinin 81.80 U/mg ve saflaştırma veriminin % 51,63 olduğu belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan teknikler ve saflaştırma basamakları, uygulanış sırasına göre bazı farklılıklar gösterse de genel anlamda daha önce yapılmış çalışmalara benzer niteliktedir. Literatürde *Bacillus subtilis* proteaz enziminin saflaştırılmasının amaçlandığı bir çalışmada amonyum sülfat çöktürmesinin ardından öncelikle DEAE-Sefaroz iyon değişim kromatografisi, ardından da Sefakril S-200 jel filtrasyon kolon kromatografisi uygulanmış, enzim 37 kez saflaştırılmış ve saflaştırma sürecinin ardından spesifik aktivitesi 39.4 U/mg hesaplanmıştır (Yang ve ark., 1999). Yapılan diğer bir çalışmada, *Bacillus licheniformis* soyundan keratinazın saflaştırılması amaçlanmıştır. Saflaştırma basamaklarında öncelikle CM-selüloz iyon değişim kromatografisi kullanılmış ve enzim 43 kez saflaştırılmıştır. İyon değişim kromatografisi ile elde edilen özüt, Sefadeks G-75 jel kromatografi kolonundan süzölmüştür. Bu iki kromatografik yöntemin ardı ardına kullanıldığı saflaştırma süreci sonunda enzim 70 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivite değeri 5.990 U/mg olarak belirtilmiştir (Xiang ve ark., 1992).

Singh ve ark., (2001) tarafından *B. sphaericus* proteazını izole etmek üzere yapılan çalışmada kültür üst sıvısı, moleküllerin geçişini 10 kDa ile sınırlayan bir membranın bulunduğu ultrafiltrasyon sistemi kullanılarak, 10 kez konsantre edilmiş ve ardından % 70 amonyum sülfat çöktürmesi ile daha ileri konsantre edilmiştir. 0.025 M, pH, 9.0 Tris-HCl tamponda çözölen çökelek, aynı tampona karşı gece boyu diyaliz edilmiştir. 1.0X10 cm fenil agaroz (hifrofobik etkileşim kromatografisi) yüklenen özütten önce kolona bağlanmayan proteinleri içeren fraksiyonlar ve ardından kolona bağlanan proteinler doğrusal etilen glikol gradyanı

kullanılarak alınmıştır. Fenil agaroz kolonundan elde edilen ve aktif proteaz içeren fraksiyonlar Q-sefaroze iyon değişim kromatografisine alınmıştır. Fraksiyonlar, 0-1 M NaCl gradyanı ile elde edilmiştir (Singh ve ark., 2001).

Uç noktada sıcaklık kararlılığı gösteren bir proteaz üreten sıcak sever *B. Stearothermophilus* F1, hurma dallarından izole edilmiştir. Isı muamelesi, ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 128 kez artmıştır. Moleküler büyüklüğü SDS/PAGE ile 33.5 kDa ve jel filtrasyon ile yalnızca 20 kDa bulunmuştur (Rahman ve ark., 1994).

Alkalofilik *B. pumilus* MK6-5'den izole edilen alkalin proteaz, amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değiştirme ve jel filtrasyon kromatografileri ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin moleküler büyüklüğü, SDS/PAGE ile 28 kDa olarak tahmin edilmiş ve jel filtrasyon kromatografisinde, moleküler büyüklüğü 26.7 kDa olan subtilisin Carlsberg'den biraz daha erken süzölmüştür. Bu da proteazın bir monomer olduğuna işaret etmiştir (Kumar, 2002).

B. subtilis PE-11 soyundan izole edilen ve sıcaklık kararlılığı gösteren serin alkalin proteaz, % 50 ve 70 amonyum sülfat çöktürmesi ve sefadeks G-200 jel filtrasyon kromatografisi (0.1-1.0 M NaCl gradyanı ile) kullanılarak saflaştırılmıştır. Moleküler büyüklüğü SDS/PAGE ile 15 kDa olarak tahmin edilmiştir. Kazeinin substrat olarak kullanıldığı koşullarda optimal sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla, 60°C ve 10.0 bulunmuştur (Adinarayana ve ark., 2003).

Bacillus sp. GYTE-L1 proteazının SDS/PAGE'de gözlenen moleküler büyüklüğünün yaklaşık 27-28 kDa olmasına karşın, proteinin nativ jele girmemesi ve zimogramda proteolitik aktiviteye işaret eden açık renkli zonun (Şekil 3.17.B) jelin hemen üst kenarında yer almasının yanında, aktif proteinin, Sefakril S-100 moleküler elekten toplanan erken fraksiyonlarda bulunması (Şekil 3.4); proteinin yüksek moleküler ağırlıklı ve daha karmaşık yapılı olabileceğini düşündürmüştür. Bu konuya daha sonra yapılacak moleküler ağırlık tayinine yönelik kromatografik çalışmalar eliyle açıklık getirilecektir.

Gupta ve ark., (2005) topraktan izole edilen *P. aeruginosa* PseA soyundan geniş bir organik çözücü grubu içinde aktif olan yeni bir alkalin proteaz elde

etmişlerdir. Q sefaroze iyon değişimi ve fenil sefaroze 6FF hidrofobik etkileşim kromatografileri kullanılarak, % 60 verimle ve 11.6 kez saflaştırılmıştır. Enzim, pH, 7.0-9.0 aralığında aktif ve pH, 6.0-9.0 aralığında kararlı olup, optimum reaksiyon pH'sı 8.0'dır. Enzimin, SDS/PAGE'de gözlenen moleküler büyüklüğünün 35 kDa olmasına karşın, denatürleyici olmayan zimogramda aktif bandın yaklaşık 160 kDa büyüklüğünde olması nedeniyle büyük ve kompleks bir protein olabileceği düşünülmüştür.

Bacillus sp. GYTE-L1 proteazını saflaştırma sürecinde kullanılan Q sefaroze iyon değişimi kromatografisinde baskın aktivitenin görüldüğü fraksiyonların dışında aktif bir diğer tepciğin görülmesi, ancak bu tepceye karşı gelen fraksiyonların protein profillerinin farklı olması; bu tez çalışmasının biyolojik materyalini oluşturan *Bacillus* sp. GYTE-L1 soyunun birden fazla proteaz üretebileceğini düşündürmüştür (Fraksiyon 93-107, Şekil 3.2 ve 3.3).

B. licheniformis MIR29'un hücre dışı proteaz aktivitesi Ferrero ve ark. tarafından (1996) % 1 jelatin içeren SDS/PAGE üzerinde irdelenmiş ve proteolitik aktiviteye işaret eden iki zon gözlenmiştir. Nativ jel kullanılan denemede de aynı sonuç alınmıştır. Denatürleyici jellerin kullanıldığı elektroforez çalışmaları, alkalen proteaz aktivitesi gösteren ve moleküler büyüklükleri 25 ve 40 kDa olan 2 protein bandının varlığına işaret etmiştir.

Singh ve ark. (2001), Himalaya'daki alkali topraklardan izole edilen zorunlu alkalofilik *B. sphaericus*'dan saflaştırdıkları iki hücre dışı alkalen proteazı karakterize etmişlerdir. Bu iki enzim benzer substrat özgüllükleri gösterirken, moleküler büyüklükleri ve hidrofobik özellikleri birbirinden farklı bulunmuştur. Proteaz A 28.7 kDa büyüklüğünde ve monomerik olduğu halde, proteaz B 68.0 kDa büyüklüğünde olup, daha küçük alt birimlerden oluşmuştur. Diğer *Bacillus* proteazlarından farklı olarak, proteaz A ve B Coomassie blue R250 ile, proteinin büyük miktarlarının yüklendiği koşullarda bile boyanmamış ve gümüş boyama yöntemi ile çok zayıf boyanmıştır. Proteaz A ve B, SDS/PAGE için jelle yüklenmeden ve kaynatılmadan önce üzerlerine PMSF eklendiği koşullarda jel üzerinde gözlenebilmiştir (Singh ve ark., 2001).

Endüstriyel alanlarda oldukça farklı sıcaklık değerlerinde aktivite gösterebilen mikrobial alkalen proteazlar kullanılmaktadır. Geçmiş yıllarda *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. thermoruber*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus* gibi mikroorganizmalar kullanılarak, 45-90 °C sıcaklık aralığında optimal aktiviteye sahip proteazlar üretilmiştir (Haki ve Rakshit, 2003). Yine *Bacillus* türlerinde yapılan çalışmalarda proteazların, pH 6.0-12.0 gibi geniş bir aralıkta aktivite gösterebildiği belirtilmiştir (Haki ve Rakshit, 2003).

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen nitelendirme çalışmaları sonucunda *Bacillus* sp. GYTE-L1 soyu tarafından üretilen alkalen proteazın optimum reaksiyon sıcaklığı 50 °C bulunmuştur. Enzim aktivitesinin 20-50 °C aralığında arttığı, 55 °C'ta optimal sıcaklıktaki aktivitenin % 95'ini koruduğu ancak 60 °C'ta aktivitenin hızla azaldığı görülmüştür.

Alkalen proteazları nitelendirmek üzere yapılan çeşitli çalışmalarda saptanan bazı optimum reaksiyon sıcaklığı değerleri GYTE-L1 proteazı için bulunan değere benzer niteliktedir. Literatürde alkalofilik *Bacillus pumilus* soyundan elde edilen alkalen proteazın nitelendirildiği çalışmada, enzimin en iyi aktiviteyi 55 °C'ta gösterdiği ve 60 °C'ta aktivitenin büyük oranda korunduğu gösterilmiştir (Kumar., 2001). Yapılan bir diğer çalışmada *Bacillus horikoshii* alkalen proteazının nitelendirilmesi amaçlanmış, bu alkalen proteazın optimum aktivitesini 40-50 °C aralığında gösterdiği belirlenmiştir (Joo ve ark., 2002). Başka bir çalışmada *Nacardiopsis* sp.'den saflaştırılan alkalen proteaz için optimum reaksiyon sıcaklığı 50 °C bulunmuştur (Moreira ve ark., 2002). *Bacillus subtilis* soyundan saflaştırılan proteaz için optimal reaksiyon sıcaklığı benzer şekilde 50 °C olarak belirlenmiştir (Yang ve ark., 1999). *Bacillus cereus* alkalen proteazının çamaşır deterjanları ile uyumunun irdelendiği bir çalışmada enzimin en yüksek aktiviteyi 50 °C'ta gösterdiği görülmüştür. Yine aynı çalışmada 30 °C, 40 °C ve 60 °C sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesinin sırasıyla % 70, % 82 ve % 30 oranında korunduğu ortaya konmuştur (Banik ve Prakash, 2004).

Farklı alkalen proteazların geniş sıcaklık aralıklarında aktivite gösterebildiği bilinmektedir. Alkalofilik *Bacillus* sp. I-312 alkalen proteazının optimum reaksiyon sıcaklığının 60-65 °C aralığında olduğu bildirilmiştir (Joo. ve Chang., 2004). Buna

karşın *Burcholderia* sp. soyundan saflaştırılan proteazın +4 °C gibi düşük sıcaklık değerlerinde aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (Jewel., 2000). Yapılan diğer bir çalışmada alkalofilik ve termofilik *Bacillus* sp. PS719 soyundan elde edilen proteazın optimal reaksiyon sıcaklığının 75 °C olduğu gösterilmiştir (Towatana ve ark., 1999).

Sıcaklık kararlılığı gösteren bir proteaz üreten sıcak sever *B. Stearothermophilus* F1'den izole edilen proteaz optimal aktivitesini pH, 9.0'da göstermiş, pH, 8.0-10.0 arasında ve 70°C'ta 24 saat boyunca kararlı bulunmuştur (Rahman ve ark., 1994).

60°C'ta ve pH, 9.0'a kadar olan pH değerlerinde büyüme yeteneğinde olan *B. licheniformis* MIR29'un ürettiği alkalen serin proteazın optimal pH'sı 12.0 ve optimal sıcaklığı 60°C bulunmuştur. Ayrıca enzimin kararlılık artırıcı ajanların bulunmadığı koşullarda 60°C'a kadar kararlı olduğu gözlenmiştir (Ferrero ve ark., 1996).

Alkalen proteazların optimum pH aralığı genellikle 9.0-11.0 olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte pH 6.0-12.5 değerleri arasında aktivite gösteren alkalen proteazlar da bulunmaktadır. Böyle geniş bir pH aralığında aktivite gösterme yeteneği, alkalen proteazların farklı endüstriyel alanlarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Kumar ve Takagi., 1999).

Literatürde alkalen proteazların optimum reaksiyon pH değerini belirlemeye yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur. *Bacillus* sp. soyundan saflaştırılan serin alkalen proteaz için optimum pH değeri 11.0 bulunmuş, enzimin pH 10.5-12.5 arasında iyi aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Kumar ve ark., 1998). Haloalkalofilik *Bacillus* sp. soyundan saflaştırılan alkalen proteazın optimum pH değerinin 10.0 olduğu belirtilmiş, enzimin pH 10.0-12.0 değerleri arasında iyi aktivite gösterdiği saptanmıştır (Gupta ve ark., 2005). Literatürde yer alan bir diğer çalışmada *Bacillus subtilis* soyundan saflaştırılan alkalen proteazın en iyi aktivite gösterdiği pH değeri 7.0 olarak belirlenmiştir (Yang ve ark., 1999). Benzer olarak *Natronococcus occultus* serin proteazı için optimum aktivite, pH 7.0'da gözlenmiştir (Studdert ve ark., 2001). Literatürde *Pseudomonas aeruginosa* PseA'nın çözücünde kararlı

alkalen proteazının, pH 7.0-8.5 aralığında iyi aktivite gösterdiği ve enzimin optimum reaksiyon pH değerinin 8.0 olduğu belirtilmiştir (Gupta ve ark., 2005). *Bacillus horikoshii*'den saflaştırılan alkalen proteazın optimum reaksiyon pH'sı 9.0 olarak belirlenmiş ve enzimin pH 8.0-11.0 aralığında iyi aktivite gösterdiği bulunmuştur (Joo ve ark., 2002).

Bu tez çalışmasında kısmen saflaştırılan *Bacillus* sp. GYTE-L1 alkalen proteazını nitelendirme çalışmaları çerçevesinde optimum pH değerini belirlemeye yönelik testler sonucunda, optimal reaksiyon pH'sı 9.0 bulunmuştur. Ayrıca enzimin pH 7.0-11.0 aralığında oldukça yüksek bir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Öte yandan *Bacillus* sp. GYTE L1 alkalen proteazının pH kararlılığının belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmış ve enzimin pH 10.0, 100 mM Glisin-NaOH tampon içinde aktivitesinin tamamını 40 saat boyunca koruduğu, ayrıca pH 7.0-11.0 aralığındaki bütün değerlerde enzim aktivitesinin % 80'in üzerinde korunduğu belirlenmiştir.

Literatürde, sıcak sever ve alkali sever *Bacillus* sp. JB-99 soyundan saflaştırılan alkalen proteazın aktivitesi farklı pH değerlerinde hazırlanan tamponlarda (sitrat fosfat pH 5.0-6.0, sodyum fosfat pH 7.0, Tris-HCl pH 8.0 ve Glisin-NaOH 9.0-13.0), 40 °C'ta 10 saat boyunca bekletildikten sonra değerlendirilmiştir. Test sonuçlarına göre enzimin pH 6.0-12.0 aralığında aktivitesini % 80 ve üstü değerlerde koruduğu belirtilmiştir (Johnvesly ve Naik., 2001). Diğer bir çalışmada, *Bacillus* soyundan elde edilen H ve N proteazların nitelendirilmesi ve özelliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda yapılan pH kararlılığı çalışmasında her iki enzim de farklı pH değerlerinde hazırlanan tamponlarda 55 °C'ta 10 dakika bekletilmiştir. Enzimlerin pH 6.0-12.0 aralığında aktivitelerinin % 80'ini korudukları belirlenmiştir. Aynı çalışmada tampon içine 2 mM CaCl₂ eklendiğinde her iki enzimin kararlılığının arttığı saptanmıştır (Kobayashi ve ark., 1995).

Alkalofilik *B. pumilus* MK6-5'den izole edilen alkalen proteazın pH kararlılığını belirlemek üzere yapılan çalışmada enzim, pH, 6.0-13.0 aralığındaki

tampon çözeltilerde 30°C'ta 30 dk bekletildikten sonra kalan proteaz aktivitesi irdelenmiştir (Kumar, 2002). Enzim 30°C'ta, pH, 6.0-12.0 aralığında 4 saat ve 6.0-11.0 aralığında 24 saat boyunca yaklaşık % 100 bir kararlılık göstermiş, ancak daha asidik koşullar altında kararsız bulunmuştur.

Alkalofilik *B. brevis*'den elde edilen alkalen proteaz pH, 10.5'de % 100, pH, 11.0'da % 92 ve pH, 11.5'de 1 saat için kararlı bulunmuştur. Literatürde, *B. alcalophilus* sub sp. *halodurans* proteazı pH, 5.0-10.0 aralığında % 100 kararlı bulunmuştur. pH, 11.0'de aktivitesi % 50'ye düşen enzim, 55°C'ta pH, 13.0'da 10 dk inkübasyon sonunda aktivitesini bütünüyle kaybetmiştir. *Bacillus* sp. AH-101 proteazı ise pH, 4.0-13.0 aralığında 60°C'ta 10 dk süreyle kararlıdır. Bu enzim için pH, 5.0-9.0 arasında % 80 oranında korunan aktivite, pH, 10.0-11.5 aralığında % 90'a yükselmiştir. Bu bulgulara göre, *B. brevis* proteazının yüksek pH'larda çok daha kararlı olduğu bildirilmiştir (Banerjee ve ark., 1999).

Bu tez çalışması çerçevesinde kısmen saflaştırılan alkalen proteazın sıcaklık kararlılığını belirlemeye yönelik analizler sonucunda; enzimin 40 °C'ta, 20 °C 'taki aktivitesinin % 82'sini, 45 °C'ta yaklaşık % 65'ini ve 50 °C'ta % 25'ini koruduğu gözlenmiştir.

Alkalofilik *B. pumilus* MK6-5'den izole edilen alkalen proteazın sıcaklık kararlılığı testinde enzim, pH, 10.5 tamponunda, 30-80°C arasındaki sıcaklıklarda 30 dk inkübe edildikten sonra kalan aktivite ölçülmüştür (Kumar, 2002). 70 ve 80°C'ta, 55-60°C'taki optimal aktivitesinin sırasıyla % 48.7 ve % 18.6'sını korumaktadır. 30-60°C arasında % 100 kararlı bulunan enzim, 70°C'ta 30 dk inkübasyon sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 65'ini korumaktadır. Daha da ötesi 60°C'ta 12 saate kadar olan inkübasyon evresinde aktivitesinin % 90'dan fazlasını ve 4 saate kadar % 100'ünü korumaktadır (Kumar, 2002).

B. stearothermophilus F1'den *E. coli*'ye klonlanan ve yüksek sıcaklık kararlılığı gösteren bir alkalen proteazın bakteriosin salgılama proteinleri yardımıyla kültür ortamına salgılandığı bir çalışmada, rekombinant enzim 70°C'ta 3 saat süreyle ısıtmaya dayalı tek basamaklı bir yöntem kullanılarak saflaştırılmıştır. Optimum pH'sı 9.0 ve optimal reaksiyon sıcaklığı 80°C olan enzim 70°C'ta, pH, 8.0-10.0

aralığında 24 saat süreyle kararlı bulunmuştur. Yüksek derecede sıcaklık kararlılığı gösteren enzimin 85°C'taki yarı ömrü 4 saat ve 90°C'ta ise 25 dk bulunmuştur (Rahman ve ark., 2003).

Kaur ve ark., (2001) tarafından *Bacillus* sp. P-2'den izole edilen ve optimal aktivitesini pH, 9.6'da gösteren proteaz, pH, 7.0-10.0 aralığında bu aktivitenin % 80'den fazlasını korumuştur. Optimum reaksiyon sıcaklığı 90°C olan enzim bu sıcaklıkta bir saatten fazla kararlılık göstermiştir. Enzim 90°C'ta bir saat inkübasyonun ardından aktivitesinin % 95'ini ve 121°C'ta ise % 37'sini korumuştur. 121°C'taki yarı ömrü 47 dk bulunmuştur. *Bacillus* sp. P-2 proteazı pH ve sıcaklık kararlılığı yönünden deterjan formülasyonlarında kullanılmak üzere mükemmel bir enzimdir. P-2 soyu, literatürde rapor edilen hiçbir mezofilin taşımadığı özelliklere sahip bir proteaz üretmektedir. Bir başka deyişle otoklav ve kaynama sıcaklığında bu denli kararlı bir proteaz üreten bir başka mezofilik organizma rapor edilmemiştir (Kaur ve ark., 2001).

Öte yandan *Bacillus* sp. kökenli proteaz ile yapılan sıcaklık kararlılığı çalışmasında enzimin 35-50 °C aralığında 60 dakika boyunca aktivitesini büyük oranda koruduğu, 60 °C'ta yarısını yitirdiği görülmüştür (Joo. ve Chang., 2004). Bir diğer çalışmada ise *Bacillus subtilis* PE-11 kökenli serin alkalen proteazın aktivitesini 60 °C'ta 350 dakika boyunca koruduğu ortaya konmuştur. Aynı çalışmada enzimin 70 °C'ta 50 dakika sonunda aktivitesinin yaklaşık % 80'ini, 80 °C'ta ise % 35'ini koruduğu belirlenmiştir (Adinarayana ve ark., 2003). *Bacillus* soyundan saflaştırılan alkalen proteazın sıcaklık kararlılığını belirlemek üzere yapılan başka bir çalışmada, enzim 20 mM borat/NaOH tamponu içinde, farklı sıcaklık değerlerinde 10 ve 20 dakika boyunca bekletilmiştir. Enzimin 50 °C'ta aktivitesini koruduğu 5 mM CaCl₂ varlığında ise aktivitesini 60 °C'a kadar koruyabildiği ortaya konmuştur (Kobayashi ve ark., 1995).

Bu tez çalışması kapsamında bazı efektör maddelerin *Bacillus* sp. GYTE-L1 proteazının sıcaklık kararlılığı üzerindeki etkileri test edilmiş, bu amaçla % 10 ve % 30 gliserol, etilen glikol ve DMSO ile 5 mM EDTA ve çeşitli derişimlerde CaCl₂ varlığında 50 °C'ta 30 ve 60 dakika inkübasyonun ardından, alkalen proteaz aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. Poliollerin enzimleri yüksek sıcaklıklarda kararlı kıldığı

ve saklama sürelerini arttırdığı bildirilmiştir (Fagain, 2003). Enzimlerin daha uzun süre saklanması amacıyla kullanılan bir poliol olan gliserol GYTE-L1 proteazının kararlılığını çok olumlu etkilemiş, enzim % 30 gliserol varlığında % 90'a varan bir kararlılık göstermiştir. Buna karşın bir diğer poliol, etilen glikol varlığında enzim kararlılığını % 48 oranında koruyabilmiştir. % 30 DMSO enzim kararlılığında gliserol ile elde edilene benzer nitelikte bir iyileşme sağlamıştır. Aktivite, 5 mM EDTA varlığında % 1'e düşmüştür.

Bacillus sp. GYTE-L1 proteazının kararlılığının CaCl_2 konsantrasyonunun artışı ile doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. 5 mM CaCl_2 varlığında 50 °C'ta enzimin başlangıçtaki aktivitesinin ilk 30 dakikada % 80 ve 60. dakikada % 73 oranında korunduğu, 10 mM CaCl_2 varlığında ise verilen süreler için sırasıyla % 100 ve % 90.9 oranında korunduğu gözlenmiştir. 10 mM CaCl_2 'ün enzim kararlılığı üzerine 60 °C'taki etkisi ayrıca değerlendirilmiş ve aktivitenin 30 ve 60. dakikalar sonunda % 60 ve % 50 oranında korunduğu saptanmıştır.

Literatürde, alkalin proteazların Ca^{+2} , Mn^{+2} gibi iki değerlikli katyonların varlığında daha iyi aktivite gösterdiğinin belirtildiği çeşitli çalışmalar mevcuttur (Kumar ve Takagi., 1999; Kumar., 2001). Bu katyonların *Bacillus* alkalin proteazlarının sıcaklık ve pH kararlılığını arttırdıkları bulunmuştur (Kobayashi ve ark., 1995; Palival ve ark., 1994).

B. subtilis PE-11 soyundan izole edilen serin alkalin proteaz sıcaklık kararlılığını belirlemek üzere, 60-70 ve 80 °C'ta, 10 mM CaCl_2 varlığında inkübe edilmiş, daha sonra aktivite testine alınmıştır (Adinarayana ve ark., 2003). Enzim 60 °C'ta 350 dk sonunda yaklaşık olarak % 100 kararlı bulunmuştur. Sıcaklık kararlılığına ilişkin daha önceki çalışmalarda; sıcaklık kararlılığı olan proteazlar için 50 °C'taki yarı ömür 200 dakikadan fazla ve 60 °C'ta 2-22 dk olarak bildirilmiştir. Subtilisin Carlsberg ve subtilisin BPN için ise 50 °C'ta sırasıyla, 3.4 dk ve 2.4 dk olarak rapor edilmiştir. PE-11 proteazı için 70 °C'taki yarı ömür 250 dk ve 80 °C'ta 50 dakikadan az bulunmuştur.

B. Stearothermophilus F1'in sıcaklık kararlılığı gösteren proteazının 85 °C'taki yarı ömrü 4 saat ve 90 °C'ta 25 dk bulunmuştur. 85 °C ve üstündeki sıcaklıklarda

gözlenen kararlılığın Ca^{2+} varlığına bağımlı olduğu belirtilmiştir. Saflaştırılan proteaz $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ta korunmuştur. Ca^{2+} tarafından sağlanan sıcaklık kararlılığı, Mn^{2+} 'ya göreceli çok daha büyüktür. Mn^{2+} ve Ca^{2+} 'nın her ikisi de enzimi aktive etseler bile, kararlılıkta yalnızca Ca^{2+} 'un önem taşıdığı anlaşılmaktadır. Ca^{2+} 'un yüksek sıcaklıklardaki enzim kararlılığı için temel bir rol oynadığı daha önce de rapor edilmiştir (Rahman ve ark., 1994).

B. subtilis PE-11 soyundan izole edilen ve sıcaklık kararlılığı gösteren serin alkalin proteazın çeşitli deterjanlar ile uyumluluğu irdelenmiş, enzimin kararlılığının 1 M glisin ve 10 mM CaCl_2 'un teker teker ya da birlikte bulunduğu koşullarda etkin şekilde iyileştiği gözlenmiştir. Enzim belirtilen koşullar altında 3 saat sonra da aktivitesinin % 52'sini korumuştur. Deterjanlardaki temizleme gücünü arttıran enzim, 1 M glisin ve 10 mM CaCl_2 varlığında kan lekelerini tamamen çıkarmıştır (Adinarayana ve ark., 2003).

Alkalofilik *B. brevis*'den elde edilen alkalin proteaz $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ta 288 saat kararlı olduğu halde, 50 ve $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'taki yarı ömrü sırasıyla 60 ve 7 saattir. Enzimin sıcaklık kararlılığı, mikro-çevresindeki değişiklikler eliyle artırılabilir. Ca^{2+} ve Na^+ 'un asetat tuzları sıcaklık kararlılığını arttırmış ve enzimi otolizisten korumuştur. 10 mM Ca^{2+} ve 1M glisinin ayrı ayrı ve birlikte kullanımı, proteazın yarı ömrünü birçok kez arttırmıştır. Bu iki maddenin varlığında enzim, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ta 4 gün sonra aktivitesinin % 50'den fazlasını korumuştur. Enzim Ca^{2+} ve glisin varlığında, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ta, çeşitli ticari deterjanlar ile uyumluluk göstermiştir. Farklı deterjanların temizleme gücünü iyileştirmiş ve kan lekelerinin bütünüyle çıkarılmasını sağlamıştır (Banerjee ve ark., 1999).

Ağır metallerin alkalin proteaz aktivitesini inhibe edebildikleri literatürde yer alan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Kumar ve Takagi., 1999; Kumar., 2001). Bu tez çalışmasında, bazı metal iyonların enzim aktivitesine etkileri test edilmiştir. Bu amaçla çeşitli metal iyonların klorla oluşturdukları tuzlar (AlCl_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 , KCl , MgCl_2 , MnCl_2 , NaCl , NiCl_2 , ZnCl_2), demir ve çinkonun sülfat bileşikleri (FeSO_4 , ZnSO_4) ve NH_4 kullanılmıştır. Metal iyonlarının 1 ve 10 mM derişimlerinin kullanıldığı çalışmada, enzim $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' ta 60 dakika bekletilmiş ve ardından aktivite testine alınmıştır. Enzim aktivitesinin, 10 Mm CaCl_2 , 1 mM NaCl ,

10 mM CuCl_2 , 1 ve 10 mM BaCl_2 , 1 mM NiCl_2 varlığında artışı gözlenmiştir. 10 mM K^+ iyonu belirgin bir etki yaratmazken, 1 mM K^+ iyonunun aktiviteyi yaklaşık % 56'ya, benzer şekilde Zn^{2+} nun klor tuzunun 1 mM derişimde aktiviteyi % 58'e ve 10 mM derişimde % 59'a düşürdüğü belirlenmiştir. 10 mM ZnSO_4 varlığında aktivitenin % 58'e düştüğü gözlenmiştir. Diğer metal iyonları ve NH_4 enzimatik aktivitede değişik oranlarda azalmaya neden olmuştur.

Sıcak sever organizma *B. Stearothermophilus* F1'in sıcaklık kararlılığı gösteren proteazı Co^{2+} ve Hg^{2+} iyonları tarafından önemli ölçüde inhibe edilmiş, Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ve Sr^{2+} iyonları ise ya küçük bir inhibisyona neden olmuş ya da etkimemişlerdir. Mn^{2+} proteaz aktivitesini güçlü şekilde aktive etmiştir (Rahman ve ark., 1994).

Alkalofilik *B. pumilus* MK6-5'den izole edilen alkalin proteazın aktivitesi Ca^{2+} , Mn^{2+} ve Mg^{2+} iyonları ile artmış ve bu iyonlar enzimi ayrıca kararlı kılmıştır. Bu bulgular ilgili katyonların proteaz yapısının kararlılığında rol aldıklarını ve sıcaklıkla denatürasyona karşı korunma için gereksinildiklerini doğrulamaktadır (Kumar, 2002).

B. subtilis PE-11 soyundan izole edilen ve sıcaklık kararlılığı gösteren serin alkalin proteaz, Ca^{2+} , Mn^{2+} ve Mg^{2+} iyonları ile kuvvetle aktive olmuştur. 5 mM PMSF ile güçlü bir şekilde inhibe olan enzimde BME ile çok hafif bir inhibisyon gözlenmiştir. EDTA'nın bu nitelikte bir etkisi olmamıştır (Adinarayana ve ark., 2003). Sonuçlar enzimin proteaz aktivitesi ve kararlılığının Ca^{2+} , Mn^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının olası aktivasyon etkinlikleri ile arttığına işaret etmiştir. Bu katyonların *Bacillus* alkalin proteazlarının sıcaklık kararlılığını arttırdığı daha önce de rapor edilmiştir.

Alkalofilik *B. brevis*'den elde edilen alkalin proteaz 1 mM Ag^+ varlığında aktivitesini bütünüyle ve Zn^{2+} ile Hg^{2+} varlığında ise kısmen kaybetmiştir. Aktivitesi kalsiyum asetat, CaCl_2 ve MnSO_4 ile uyarılan enzim, Mg^{2+} varlığında kısmen inhibe olmuştur (Banerjee ve ark., 1999).

Gupta ve ark. (2005) tarafından topraktan izole edilen *P. aeruginosa* PseA soyu geniş bir organik çözücü grubu içinde aktif olan yeni bir alkalen proteaz salgılamaktadır. Proteazın metalloprotein olduğunu düşündüren bulgular elde edilmiştir. Ni^{2+} ve Cu^{2+} proteaz aktivitesini önemli ölçüde (% 11.9 ve 21.2) azaltırken; Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} ve Ca^{2+} 'un daha hafif etkilediği saptanmış, hiçbir örnekte çökelme görülmemiştir. 5 mM EDTA proteolitik aktiviteyi % 75 inhibe etmiştir (metalloproteaz).

Deterjan endüstrisinde kullanılan proteazların, alkali pH değerlerinde aktivite göstermeleri ve deterjanlarda bulunan, yüzey aktif maddelere, kelatörlere ve oksidasyona neden olan ajanlara dayanıklı olmaları gerekmektedir (Maurer, 2004; Joo ve ark., 2002)

Geniş bir organik çözücü grubu içinde aktif olan *P. aeruginosa* PseA alkalen proteazı, PMSF'den ve % 0.1 Triton X-100, % 0.5 Tween 80 gibi sürfaktanlardan etkilenmezken, % 0.1 CTAB ve % 0.1 SDS varlığında aktivitesinde % 47 ve 39 oranında azalma görülmüştür. 40-65 °C sıcaklık aralığında belirgin aktivite gösteren enzimin optimal reaksiyon sıcaklığı 60 °C'tır. 60 °C'ta 30 dk boyunca % 100 kararlılık gösteren enzim, 65 ve 70 °C'ta 10 dk inkübasyon sonunda aktivitesini % 33 ve 80 oranında kaybetmiştir (Gupta ve ark., 2005).

Tez çalışması kapsamında çeşitli deterjanların alkalen proteaz aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi test edilmiştir. % 0.1 ve % 10 oranında deterjan varlığında yapılan testler sonucunda; bir yüzey aktif madde olan SDS'in enzim aktivitesini hemen hemen bütünüyle inhibe ettiği gözlenmiştir. Tween 20'nin % 0.1 derişimde eklenmesinden hemen sonra aktivitenin % 140'a yükseldiği, ancak 60 dakika sonunda % 86'ya gerilediği, % 1 derişimde ise aktivitenin başlangıçta % 150 ve 60 dk sonra % 129'a yükseldiği belirlenmiştir. % 0,1 Triton X-100 varlığında aktivitenin kısmen arttığı, % 1 derişimde ise başlangıçta ve 60. dakikada aktivitenin yaklaşık % 150'ye varan oranlarda yükseldiği belirlenmiş, CTAB varlığında enzim aktivitesinin özellikle başlangıçta arttığı gözlenmiştir. % 0,1 deoksikolat varlığında aktivitenin yalnızca başlangıçta hafifçe artmasına karşın, % 1 derişimde hem başlangıçta hem de 60. dakika sonunda belirgin bir inhibisyon saptanmıştır.

Joo ve ark. (2004), bazı deterjanların *Bacillus* sp. KSM-K16 alkalen proteazı ve *Bacillus pumilus* alkalen proteazı üzerine etkilerini değerlendirmiştir. % 0.1 ve % 5 oranında deterjan kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, % 5 SDS varlığında *Bacillus* sp. KSM-K16 alkalen proteazının aktivitesinin 4. saatin sonunda % 75 oranında korunduğu, *Bacillus pumilus* alkalen proteazının ise % 0.1 SDS varlığında 1 saat sonunda aktivitesinin % 22'sini kaybettiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada Tween 20 varlığında enzim aktivitesinin az miktarda da olsa arttığı saptanmıştır (Joo ve ark., 2004). *Bacillus* sp. soyundan saflaştırılan serin alkalen proteaz ile yapılan başka bir çalışmada 30 °C'ta 30 dakika süreyle çeşitli deterjanlar varlığında bekletilen enzimin aktivitesinin, Triton X-100'ün farklı konsantrasyonlarında ciddi şekilde etkilenmediği belirlenmiştir. SDS'in % 0.1'lik derişimde enzim aktivitesini yaklaşık % 25 oranında ve % 0.5 derişimde oldukça etkin şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (Kumar ve ark., 1999). Öte yandan alkalofilik *B. brevis*'den elde edilen alkalen proteazın aktivitesi SDS varlığında % 40 dolaylarında, üre varlığında ise % 95 bulunmuştur (Banerjee ve ark., 1999).

Bu tez çalışmasında kelatör özelliği ile bilinen EDTA'nın enzim kararlılığı üzerine etkisi test edilmiştir. Bu amaçla 5 mM EDTA varlığında 50 °C'ta, 30 ve 60 dakika inkübasyonun ardından yapılan aktivite testinde, enzim aktivitesinin her iki zaman aralığında da kaybolduğu görülmüştür. Proteazların EDTA'ya duyarlı olduğu farklı yayınlarda rapor edilmiştir (Gnosspelius., 1978; Manachini ve ark., 1988; Singh ve ark., 2001; Yang ve ark., 1999; Huang ve ark., 2002; Gupta ve ark., 2005).

Tez çalışmasında 5 mM EDTA'nın 50 °C ve 60 °C taki enzim kararlılığını 10 mM CaCl₂ varlığında nasıl etkilediği de irdelenmiştir. Bu amaçla 50 °C'ta yapılan testler sonunda 5 mM EDTA'nın enzim kararlılığı üzerindeki olumsuz etkisinin, verilen konsantrasyondaki CaCl₂ varlığında ortadan kalktığı görülmüştür. 60 °C sıcaklıkta yalnızca EDTA varlığında aktivitesini büyük oranda kaybeden enzimin, 5 mM EDTA+10 mM CaCl₂ varlığında başlangıçtaki aktivitesini, 10. dakikaya kadar bütünüyle ve 30. dakika sonunda ise % 60 oranında koruduğu saptanmıştır.

EDTA deterjan endüstrisinde katkı maddesi olarak kullanılan bir kelatördür. EDTA varlığında aktivitesinin azalması *Bacillus* sp. GYTE L1 proteazının deterjan

endüstrisinde kullanılmasını zorlaştırmakla birlikte, enzimin ortamda CaCl_2 'ün de bulunduğu koşullarda deterjan endüstrisinde kullanılabileceği düşünülmüştür.

Literatürde EDTA'nın proteaz aktivitesini inhibe etmediği çalışmalar da bulunmaktadır. *Bacillus subtilis* PE-11 soyundan saflaştırılan serin alkalen proteaz ile yapılan nitelendirme çalışmaları çerçevesinde gerçekleştirilen enzim kararlılığı testleri sonucunda 5 mM EDTA varlığında 60 °C'ta 30 dakika sonunda enzim aktivitesinin % 106 oranında korunduğu gösterilmiştir (Adinarayana ve ark., 2003). Literatürde yer alan diğer bir çalışmada *Pleurotus ostreatus* proteazının 1 mM EDTA varlığında 37 °C'ta 2 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin tamamını koruduğu ortaya konmuştur.

Singh ve ark., (2001) *B. sphaericus*'dan saflaştırdıkları iki hücre dışı alkalen proteazı proteaz inhibitörleri ile 2 saat boyunca inkübe ettikten sonra, A ve B enzimlerinde kalan aktiviteyi değerlendirmişlerdir. EDTA, proteaz A'yı % 27.4 ve proteaz B'yi % 40.5 oranında inhibe ederken, bir diğer metalloproteaz inhibitörü olan fenantrolein, EDTA'nın aksine enzim aktivitesini etkilememiştir. Serin proteazlar için aktif bölge inhibitörü olan PMSF her iki proteazı da hemen bütünüyle inhibe etmiştir. Metalloproteazların sınıflandırılmasının temeli bir metal iyonunun özellikle de çinkonun varlığına bağlı olup, bu iyon kataliz sürecine katılır ve fenantrolein çinko için kalsiyumdan daha yüksek bir kararlılık gösrerken ve tercih edilen bir metalloproteaz tanı aracıdır. Bu bulgulardan hareket edilerek, enzimlerin serin proteaz ailesine dahil oldukları sonucuna varılmıştır (Singh ve ark., 2001).

Bu tez çalışması kapsamında, serin proteaz inhibitörü olan PMSF'in (Beynon ve Bond., 2001) kısmen saflaştırılan *Bacillus* sp. GYTE-L1 soyu alkalen proteazı üzerindeki etkisi irdelenmiştir. 10 mM PMSF ile 37 °C'ta, 5, 10 ve 30 dakika inkübasyonun ardından başlangıçtaki enzim aktivitesinin yaklaşık % 16-19'a gerilediği belirlenmiştir.

Kumar (2001) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 1 mM PMSF'in *Bacillus pumilus* alkalen proteazının aktivitesini 30 °C'ta, 30 dk inkübasyon sonunda % 1'e düşürdüğü belirtilmiştir. *Bacillus* sp. den saflaştırılan serin alkalen proteazı ile yapılan diğer bir çalışmada 1 mM PMSF varlığında 30 °C'ta, 30 dakika bekletilen

enzimin aktivitesinin başlangıç aktivitesine oranla % 1'e gerilediği belirlenmiştir (Kumar ve ark., 1998). *Bacillus* sp. I-312 alkalen proteazının saflaştırılması ve nitelendirmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada ise 0.5 mM PMSF varlığında, oda sıcaklığında 72 saat inkübasyonun sonunda enzim aktivitesinin yaklaşık % 95'inin yitirildiği saptanmıştır (Joo ve Chang., 2004).

B. sphaericus'dan elde edilen iki proteazın aktivitelerinin PMSF ile hemen hemen bütünüyle inhibe olduğu, buna karşın tripsin ve kimotripsin inhibitörleri ve tiyol bileşikler ile çok az inhibe oldukları, ya da hiç etkilenmedikleri belirlenmiş, bu enzimlerin serin proteaz ailesinde yer aldıkları düşünülmüştür (Singh ve ark., 2001). Buna karşın, *Burkhoderia* 2.2 N soyundan elde edilen proteaz enzimi ile yapılan çalışmada, 1 mM ve 10 mM PMSF derişimlerinde 37 °C'ta 30 dakika süren inkübasyonun, enzim aktivitesini belirgin bir şekilde etkilemediği gözlenmiştir (Jewel., 2000).

B. licheniformis MIR29'un proteaz aktivitesi PMSF ile ciddi şekilde inhibe olmuş, buna karşın EDTA, amonyum sülfat ve ürenin bu nitelikte bir etkisi gözlenmemiştir. MIR29'un SDS ile hafifçe inhibe olan enzim aktivitesi, CaCl₂ varlığında da artmamıştır (Ferrero ve ark., 1996). Sıcak sever *B. Stearothermophilus* F1'in ürettiği proteazın aktivitesi, 2.5 ve 10 mM PMSF varlığında 30 dk inkübasyonun sonunda kaybedilirken, EDTA aktivite üzerinde ciddi bir etki yaratmamıştır (Rahman ve ark., 1994).

Bu tez çalışmasında enzim aktivitesi 10 mM EDTA ve PMSF'in yanı sıra, 10 mM BME ve çeşitli derişimlerde DTT'nin varlığında değerlendirilmiştir. 10 mM EDTA varlığında 30. dakikada, enzimin başlangıçtaki aktivitesinin ancak % 32.22'sini koruyabildiği, 10 mM PMSF varlığında % 80'e yakın oranda inhibe olduğu, 10 mM BME ile başlangıç aktivitesinin yarısından fazlasını koruduğu ve 10 mM DTT için bu değerin yaklaşık % 88'e ulaşabildiği gözlenmiştir. Diğer örnekler ile birlikte 37°C'ta 60 dk süreyle imkübe edilen *Kontrol 2*, enzimin başlangıçtaki aktivitesinin (*Kontrol1*) yaklaşık % 61'ini korumuştur.

Literatürde, *Burkhoderia* 2.2 N soyundan saflaştırılan proteaz enzimi ile gerçekleştirilen nitelendirme çalışmasında, 37 °C'ta farklı DTT derişimlerinde 30

dakika bekletilen enzimin aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Enzim aktivitesinin 1 mM DTT ile % 29 oranında ve 10 mM DTT ile % 84 oranında azaldığı belirtilmiştir (Jewel., 2000). *P. aeruginosa* PseA soyu alkalin proteazının aktivitesi 1mM DTT ile % 32'ye ve 5 mM DTT ile % 0'a düşerken, β ME'ün etkin olmadığı gözlenmiştir. (Gupta ve ark., 2005).

P. aeruginosa PseA soyu alkalin proteazı en yüksek aktivitesini kazeine karşı göstermiştir. 30°C'ta ve pH, 8.0'da organik çözücülerin (% 25 sikloheksan ve DMF) varlığında yapılan çalışmada yaklaşık 54 saat boyunca kararlı bulunmuştur. Sürfaktan ve sıcaklık kararlılığı bu proteazı ayrıca çamaşır deterjanlarında kullanılmak üzere elverişli kılmaktadır (Gupta ve ark., 2005).

Tez kapsamında bazı organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, % 10 ve % 30 oranında organik çözücü varlığında 40 °C sıcaklıkta gerçekleştirilen çalışmada, 40°C'ta diğer örnekler ile birlikte 60 dk boyunca inkübe edilen enzim örneğinin (*Kontrol 2*) başlangıçtaki aktivenin ancak % 2.3'ünü koruyabildiği gözlenmiştir. *Kontrol 1*'de elde edilen başlangıç aktivitesi % 30 DMSO varlığında % 93.1, % 10 aseton veya izoamilalkol varlığında yaklaşık % 69 oranında korunmuştur. İzopropanol, etanol ve asetonitrilin farklı derişimleri sıcaklık kararlılığını *Kontrol 2*'ye göreceli olarak 25 keze varan oranlarda iyileştirmiştir (Tablo 3.4 ve Şekil 3.11).

4.1. Sonuçlar

Bu tez çalışmasında Gönen Dağ Ilıcası'ndan izole edilmiş yerel *Bacillus* sp. GYTE-L1 soyu, alkalin proteaz enzimini elde etmek üzere biyolojik kaynak olarak kullanılmıştır. *Bacillus* sp. GYTE-L1 alkalin proteazını saflaştırma sürecinde, amonyum sülfat çöktürmesi, Q-sefaroze anyon değişimi ve Sefakril S-100 moleküler elek kolon kromatografileri kullanılmıştır.

- Saflaştırma sürecinin sonunda enzimin spesifik aktivitesinin 81.80 U/mg ve saflaştırma veriminin % 51.63 olduğu belirlenmiştir. Kısmen saflaştırılan enzim, kararlılığını +4°C'ta 6 ay süreyle korumuştur.

- *Bacillus* sp. GYTE-L1 proteazının SDS/PAGE’de gözlenen moleküler büyüklüğünün yaklaşık 27-28 kDa olmasına karşın, bulgular proteinin yüksek moleküler ağırlıklı ve daha karmaşık bir yapıya sahip olabileceğini düşündürmüştür.

- Bulgular, bu tez çalışmasının biyolojik materyalini oluşturan *Bacillus* sp. GYTE-L1 soyunun birden fazla proteaz üretebileceğini düşündürmüştür.

- Kısmen saflaştırılan alkalen proteazın optimum reaksiyon sıcaklığı 50-55 °C ve optimal reaksiyon pH’sı 9.0 bulunmuştur.

- Enzim, pH 10.0, Glisin-NaOH tampon içinde aktivitesinin tamamını 40 saat boyunca korumuş ve pH 7.0-11.0 aralığındaki bütün değerlerde yüksek derecede kararlı bulunmuştur.

- *Bacillus* sp. GYTE-L1 proteazı % 30 gliserol ve DMSO varlığında 50 °C’ta 1 saat boyunca % 90’a varan bir kararlılık göstermiştir.

- 10 mM CaCl_2 ’ün enzimin sıcaklık kararlılığını 50 ve 60 °C’ta çok etkin şekilde arttırdığı bulunmuştur.

- Enzimin kararlılığının başta DMSO, aseton ve izoamilalkol olmak üzere çeşitli organik çözücüler içinde korunduğu ve iyileştiği belirlenmiştir.

- Enzim aktivitesinin, Ca^{2+} , Na^+ , Cu^{2+} , Ba^{2+} ve Ni^{2+} iyonlarının varlığında arttığı, K^+ ve Zn^{2+} iyonları ile inhibe olduğu gözlenmiştir.

- Deterjan varlığında yapılan çalışmada, SDS ve deoksikolatın enzimin başlangıçtaki aktivitesini kuvvetle indirgemesine karşın, Tween 20, Triton X-100 ve CTAB’ın değişen miktarlarda arttırdığı görülmüştür

- EDTA ve PMSF’in enzimi inhibe ettiği, buna karşın DTT’nin enzim kararlılığını arttırdığı saptanmıştır. 5 mM EDTA ile oluşan inhibisyonun gücü GYTE-L1 proteazının bir metalloenzim olduğuna ve PMSF ile % 80 oranında gerçekleşen inhibisyon, enzimin bir serin proteaz olduğuna işaret etmiştir. Enzim aktivitesinde 5 mM EDTA varlığında oluşan inhibisyon 10 mM CaCl_2 varlığında gözlenmemiştir.

Deterjan formülasyonlarında kullanılan enzimler ideal olarak geniş bir sıcaklık ve pH aralığında yüksek düzeyde aktivite göstermelidir. Tez çalışması kapsamında saflaştırılarak, nitelendirilen enzim, optimal aktiviteyi 50-55°C’ta göstermektedir. Deterjan endüstrisinde kullanılan iki önemli proteaz; subtilisin Carlsberg ve subtilisin Novo (Bakteriyel Proteaz Nagaz, BPN) ise 60°C’ta optimal aktivite göstermektedir.

Enzimin optimal pH/sıcaklık değerlerine ek olarak, pH, 7.0-11.0 aralığında kararlı olması ve Ca^{2+} , DMSO ve gliserol varlığında iyileşen sıcaklık kararlılığı; GYTE L-1 proteazını çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için çekici bir aday kılmakta, buna karşın SDS ve deoksikolatın yanı sıra EDTA'nın enzim aktivitesini inhibe etmesi; saflaştırılarak nitelendirilen enzimin deterjan endüstrisinde kullanımını güçleştirecek özellikler olarak görülmektedir. Öte yandan 60°C'ta 5 mM EDTA varlığında aktivitesini bütünüyle kaybeden enzimin, 10 mM CaCl_2 varlığında başlangıçtaki aktivitesinin % 62'sini koruduğunun gösterilmesi, bu konsantrasyondaki Ca^{2+} iyonlarının inhibitörün etkisini ortadan kaldırdığını ve ayrıca enzimin yüksek sıcaklıklardaki aktif yapısını korumak üzere can alıcı bir rol oynadığını düşündürmektedir. Çeşitli çözücülerde de kararlı olan enzim ayrıca bazı deterjan ve surfaktanlar ile de uyumlu bulunmuştur. Enzim bu özellikleri ile bazı deterjan formülasyonları ve enzimatik peptit sentezinde kullanılmak üzere elverişli görünmektedir.

Alkalen proteaz enziminin 50 ve 60°C'taki kararlılığını arttıran maddelerin daha yüksek sıcaklıklardaki etkinliğinin araştırılması; enzimin moleküler büyüklüğünün belirlenmesi/doğrulanması, SDS ve kelatlayıcı ajan EDTA varlığında gözlenen güçlü inhibisyona karşın, Triton X-100 ve Tween 20 gibi iyonik ajanların varlığında artan kararlılık gözetilerek, enzimin hangi koşullarda deterjan katkı maddesi olarak kullanılabileceğinin irdelenmesi; enzimin ticari deterjanların varlığındaki etkinliğinin belirlenmesi, yıkama testlerinin gerçekleştirilmesi ve morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre bir *B. pumilus* soyu olduğu düşünülen GYTE-L1'in ayrıca, 16S rDNA analizi gibi moleküler temelli teknikler eliyle tiplendirilmesi yakın gelecekte yapılması planlanan çalışmalardır.

KAYNAKLAR

1. Adinarayana, K., Ellaiah, P., and Prasad, D.S. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech*, 2003; 4 (4) Article 56.
2. Anwar, A., Saleemuddin, M., Alkaline Proteases: a Review. *Bioresource Technology*, 1998; 64: 175-183.
3. Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R., Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry* 35: 213-219. 1999
4. Battal, M., Alkalen proteaz üreticisi yerel *bacillus* soylarının izolasyonu, nitelendirilmesi ve enzim üretiminin optimizasyonu. GYTE Moleküler Biyoloji Laboratuvarı Yüksek Lisans Çalışması. 2004
5. Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; and Stryer, Lubert., *Biochemistry* 5th Edition, New York: W. H. Freeman and Co., 2002
- Beynon, R., Bond. J.S. *Proteolytic Enzymes* 2nd Edition, Oxford University Press., 2001.
6. DeMartino, G.N., Slaughter, C.A. The Proteasome, a Novel Protease Regulated by Multiple Mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 22123-22126;
7. Dennison C., *A guide to protein isolation*, USA: Kluwer Academic Publishers, 2002
8. Extracellular Protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied And Environmental Microbiology*, 2001; 67:2754–2759.
9. Gnosspeius, G. Purification and properties of an extracellular protease from *Myxococcus virescens*. *J Bacteriol*, 1978; 133: 17– 25.
10. Gupta, A., Roy, Ipsita., Patel, R.K., Singh, S.P., Khare, S.K. and Gupta, M.N. One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Journal of Chromatography A*, 2005; 1075:103–108.
11. Gupta, A., Roy, I., Khare, S.K., Gupta, M.N. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Journal of Chromatography A*, 2005.

12. Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2002; 59: 15-32.
13. Haki, G.D., Rakshit, S.K. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a review; *Bioresource Technology*, 2003; 89: 17-34.
14. Hedstrom, L., Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews*, 2002;102: 4501-4523.
15. Horikoshi, K., Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology; *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999; 63: 735-750.
16. Horikoshi, K.; Alkaliphiles – from an industrial point of view; *FEMS Microbiology Reviews*, 1996;18: 259-270.
17. Jewell, S.N. Purification and characterization of a novel protease from *Burkholderia* strain 2.2 N. Master of Science Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, 6 Eylül 2000.
18. Joo, H.S., Chang, C.S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties.
19. Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Kim, K.T., Paik, S.R., Chang C.S. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry*, 2002; 38: 155-159.
20. Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., Hoondal, G.S, Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. *World Journal of microbiology and Biotechnology*. 17: 125-129. 2001
21. Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. Industrial Enzyme Applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002;13: 345-351.
22. Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., Industrial Enzyme Applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004;15: 1-5.
23. Kobayashi, T., Hakamada, Y., Hitomi, J., Koike, K., Ito, S., Purification of alkaline proteases from a *Bacillus* strain and their possible interrelationship. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996; 45:65-71.
24. Kumar, C.G. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Letters in Applied Microbiology*, 2002; 34: 13-17.
25. Kumar, C.G., Takagi, H., Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint. *Biotechnology Advances*, 1999;17: 561-594.

26. Kumar, C.G., Tiwari, A M.P., Jany, K.D. Novel Alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.:purification and some properties. *Process Biochemistry*, 1999; 34: 441–4.
27. Kumar, C.G., Tiwari, M.P. and Jany, K.D. Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.:purification and some properties. *Process Biochemistry*, 1999; 34:441–449.
28. Lin, X., Lee, C.G., Casale, E.S. and Shih, J.C.H. Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading *Bacillus licheniformis* Strain. *Applied And Environmental Microbiology*,1992; 3271-3275.
29. Manachini, PL, MG, Fortina and C, Parini. Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermorubber* a new sp. of *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988; 28: 409– 413.
30. Maurer, K.-H. Detergent Proteases. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004;15: 1-5.
31. Moreira, K.A., Porto, T.S., Teixeira, M.F.S., Porto, A.L.F., Lima, Filho J.L. New alkaline protease from *Nocardiopsis* sp.: partial purification and characterization. *Process Biochemistry*, 2003; 39:67-72.
32. Nduwimana, J., Guenet, L., Dorval, I., Blayau, M., Le Gall, J.Y.,Le Treut, A. Proteases (Review article). *Ann. Biol. Clin.* 1995;53: 251-264.
33. Paliwal, N., Singh, SP., Garg, SK. Cation-induced thermal stability of an alkaline protease from a *Bacillus* sp. *Bioresource Technol*, 1994; 50:209–11.
34. Palmieri, G.,1 Bianco, C., Cennamo, G., Giardina, P.,Marino, G., Monti, M., and Sanna, G. Purification, Characterization, and Functional Role of a Novel
35. Polgar, L. Common Feature of the Four Types of Protease Mechanism; *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1990; 371: 327-331; *Process Biochemistry*, 2005; 40:1263–1270.
36. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998; 62: 597-635.
37. Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barrett, A.J., MEROPS: the Peptidase Database; *Nucleic Acids Research*, 2004; 32: 161-164.
38. Scopes, K.R, *Protein Purification, Principles and Practise* 3rd Edition, New york: Springer-Verlag New York Inc. 1994.

39. Siezen, R.J., Leunissen J.A.M., Subtilases: The Superfamily of Subtilisin-like Serine Proteases. *Protein Science*, 1997; 6: 501-523. *sphaericus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2001; 26: 387 –393.

40. Singh, J., Vohra, RM. and Sahoo, DK. Purification and characterization of two extracellular alkaline proteases from a newly isolated obligate alkalophilic *Bacillus Sphaericus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2001; 26: 387 –393.

41. Singh, J., Vohra, RM. and Sahoo, D.K. Purification and characterization of two extracellular alkaline proteases from a newly isolated obligate alkalophilic *Bacillus*

42. Studdert, C.A., Seitz, M.K.H., Gil, M.I.P., Sanchez, J.J and De Castro, R.E. Purification and biochemical characterization of the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus* extracellular serine protease. *J. Basic Microbiol*, 2001; 41: 6, 375–383.

43. Towatana, N.H., Panupong, A. and Suntinanalert, P. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from Alkaliphilic and Thermophilic *Bacillus* sp. PS7 19. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 1999; Vol.87, No. 5, 581-587.

44. Yang, J.K., Shihb, I.L., Tzengc, Y.M., Wanga, S.L. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000; 26: 406–413.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Ordu’da doğdu. 2001 yılında, Sivas, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimini tamamlayarak aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Enstitü’ de yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.