KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bacillus clausii GMBAE 42'den SAFLAŞTIRILAN ALKALEN PROTEAZIN TERMAL İNAKTİVASYON KİNETİĞİNİN BELİRLENMESİ ve Cu^{2+} İYONLARI ile TERMOSTABİLİZASYONU

YÜKSEK LİSANS

Kimyager Nurçin ÇELİK

Anabilim Dalı: Kimya

Danışman: Prof. Dr. A. Altan ERARSLAN

KOCAELİ, 2006

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bacillus clausii GMBAE 42'den SAFLAŞTIRILAN ALKALEN PROTEAZIN TERMAL İNAKTİVASYON KİNETİĞİNİN BELİRLENMESİ ve Cu^{2+} İYONLARI VARLIĞINDA TERMOSTABİLİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Nurçin ÇELİK

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 26 Aralık 2006

Tezin Savunulduğu Tarih: 6 Şubat 2007

Tez Danışmanı	Üye	Üye
Prof.Dr.A.Altan ERARSLAN	Prof.Dr.Dilek KAZAN	Prof.Dr.Oğuz OKAY
(.....)	(.....)	(.....)

KOCAELİ, 2006

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Mikrobiyal proteazlar, endüstriyel enzimlerin önemli gruplarından biridir. Proteazlar, çeşitli kullanım alanlarına sahip olması nedeniyle dünyadaki enzim pazarının %75'ini oluştururlar. Mikrobiyal proteazlar arasında en çok payı ise alkalen pH (pH 8-12) ve yüksek sıcaklık aralığında (50-70°C) aktif ve stabil kalabilen alkalen proteazlar alır. Protein mühendisliği uygulamaları için doğal ekosistemlerde yaşayan, alkalen proteaz üreticisi yeni mikroorganizmaların keşfedilmesi her zaman gündemde olup birçok ülke, kendi doğal ekosistemlerini alkalen proteaz üreticisi mikroorganizmalar yönünden taramakta, ekstrem şartlara daha dayanıklı mikroorganizmalar keşfetmeye çalışmaktadır. Alkalifilik mikroorganizmalar içerisinde proteaz aktivitesi *Bacillus* genusu üyeleri içerisinde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu nedenle, alkalifilik *Bacillus* soyları hem akademik çalışmalar hem de endüstriyel uygulamalar için ilginç ve çok önemlidir. Yüksek sıcaklık ve pH'larda büyüyen *Bacillus* soyu mikroorganizmalar tarafından üretilen alkalen proteazlar, deterjanlara katkı maddesi olarak eklenmekte ve daha etkin yıkama sağlamaktadır.

TÜBİTAK-MAM-GMBE, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı ile birlikte kolaboratif bir çalışmayla, ülkemizdeki yerel ekosistemlerden taranarak izole edilen *Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan alkalen proteaz üreticisi olarak tanımlanmış *Bacillus clausii* GMBAE 42 soyu tarafından üretilen alkalen proteaz enziminin inaktivasyonunun ve yüksek sıcaklıklara karşı metal iyonları ile stabilizasyonunun incelendiği bu çalışma, ileride uygulamaya yönelik yapılacak çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

Tez çalışmam süresince, beni yönlendiren, destekleyen ve yetişmemde büyük katkısı olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet Altan ERARSLAN'a, her türlü desteğini vererek bilgisini paylaşan Sayın Prof. Dr. Dilek KAZAN ve Dr. Aziz Akın DENİZCİ'ye, deneysel çalışmalarımı yaptığım süre boyunca bana her türlü imkanı sağlayan TÜBİTAK-MAM-GMBE'ye, laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan ve her konuda destek olan Dr. Dilek COŞKUNER ÖZTÜRK, Nesrin KARAHAN, Dr. Hülya BAL ve Mine Nazan KERİMAK ÖNER'e, çalışmalarım boyunca bana her konuda gereken yardım, anlayış ve sabrı gösteren sevgili aileme ve manevi desteklerinden dolayı tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ v
TABLOLAR DİZİNİ vii
SİMGELER DİZİNİ viii
ÖZET ix
İNGİLİZCE ÖZET x

BÖLÜM 1. GİRİŞ 1

BÖLÜM 2. PROTEOLİTİK ENZİMLER (PROTEAZLAR) 5
2.1. Giriş 5
2.2. Proteazlar 6
2.2.1. Proteazların sınıflandırılması 7
2.2.2. Katalitik mekanizmalarına göre proteazlar 9
2.2.3. Proteazların fizyolojik işlevleri 15
2.2.4. Proteaz kaynakları 16
2.2.5. Alkalen proteazların özellikleri 22
2.2.6. Proteazların endüstriyel uygulamaları 24
2.2.7. Tez çalışmasında kullanılan *Bacillus clausii* GMBAE 42 enziminin. .....
özellikleri 27
2.2.7.1. Genel özellikler 27
2.2.8. Tez çalışmasında kullanılan kinetik ve termodinamik bağıntılar 27
2.2.8.1. K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi için Michaelis-Menten denklemi 27
2.2.8.2. Hidroliz reaksiyonunun aktivasyon enerjisi 29
2.2.9. Enzimin termal inaktivasyonu söz konusu olduğunda kinetik bağıntılar 30
2.2.10. Enzimin inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) 32
2.2.11. Enzimin termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik bağıntılar 32
2.2.12. Substrat hidrolizine ilişkin termodinamik bağıntılar 33
2.2.13. Enzimin aktivasyonu söz konusu olduğunda kinetik bağıntılar 33
2.3. Alkalen Proteazın Otolitik Hidrolizi 36
2.4. Tez Çalışmasında Kullanılan İstatistiksel Hesaplamalar 37

BÖLÜM 3. MALZEME ve YÖNTEM 38
3.1. Araştırma Araçları 38
3.1.1. Araştırma olanakları 38
3.1.2. Kimyasallar 38
3.1.3. Mikroorganizma 38
3.1.4. Alkalen proteaz enziminin üretimi 38
3.2. Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması 38
3.2.1. Alkalen proteaz aktivitesinin belirlenmesi 39

3.2.1.1. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması 39
3.2.2. Protein miktarının belirlenmesi..... 40
3.2.2.1. Protein standart grafiğinin hazırlanması… 40
3.3. Alkalen Proteazın Termal İnaktivasyonunun İncelenmesi 40
3.3.1. Alkalen proteazın sıcaklık stabilitesi üzerine metal iyonlarının etkisi..... 40
3.3.2. Alkalen proteazın termal inaktivasyonunun incelenmesinde substrat olarak Hammersten kazein kullanılması 41
3.3.3. Alkalen proteazın termal inaktivasyonunun incelenmesinde substrat olarak kazein kullanılması 42
3.3.4. Alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi 43
3.3.5. Alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi..... 43
3.3.6. Alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizi için Michaelis-Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi..... 44
3.3.7. Enzimin sıcaklık profili ve kazein hidrolizi için Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi 44
3.3.8. Alkalen proteazın kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametrelerin belirlenmesi… 45
3.3.9. Cu^{2+} iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi 45
3.3.10. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren alkalen proteazın termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesi..... 46
3.3.11. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren alkalen proteazın kazein hidrolizi için Michaelis-Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi 46
3.3.12. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin sıcaklık profili ve kazein hidrolizi için Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi..... 47
3.3.13. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi 47
3.3.14. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren alkalen proteazın kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi 48
3.3.15. 5 mM Cu^{2+} iyonlarının alkalen proteaz üzerindeki aktivasyonuna ilişkin kinetik parametrelerin belirlenmesi 48
3.3.16. 5 mM Cu^{2+} iyonları yokluğunda ve varlığında alkalen proteazın otokatalitik hidrolizinin incelenmesi 49

BÖLÜM 4. SONUÇLAR..... 50
4.1. Alkalen Proteazın Termal İnaktivasyonunun İncelenmesi 50
4.1.1. Metal iyonlarının alkalen proteaz üzerine etksi 50
4.1.2. Alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi (Hammersten kazein substrat)..... 51
4.1.3. Alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi (kazein substrat)..... 53
4.1.4. Alkalen proteaz enziminin inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesi 54
4.1.5. Alkalen proteazın termal inaktivasyonuna ilişkin hesaplanan termodinamik parametreler..... 54
4.1.6. Alkalen proteaz enziminin kinetik parametrelerinin belirlenmesi 56

4.1.7. *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının sıcaklık profili ve kazein hidrolizi için Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi 62
4.1.8. *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazı ile farklı sıcaklıklardaki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreler 64
4.1.9. 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında alkalen proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi 64
4.1.10. 5 mM $CuCl_2$ iyonları içeren alkalen proteaz enziminin inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesi 66
4.1.11. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren alkalen proteazın kazein hidrolizi için Michaelis-Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi 67
4.1.12. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının sıcaklık profili ve kazein hidrolizi için Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi 72
4.1.13. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren *B. clausii* alkalen proteazın termal inaktivasyonuna ilişkin hesaplanan termodinamik parametreler 74
4.1.14. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazı ile farklı sıcaklıklarda kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreler 74
4.1.15. Alkalen proteazın 5 mM Cu^{2+} iyonları tarafından aktivasyonuna ilişkin kinetik parametreler 75
4.1.16. 5 mM Cu^{2+} iyonları ilavesinin alkalen proteazın otokatalitik hidrolizi üzerine etkisi 78

BÖLÜM 5. TARTIŞMA ve ÖNERİLER 80
5.1. Alkalen Proteaz Enzimi ve 5 mM $CuCl_2$ İçeren Enzimin Stabilizasyon Çalışmasına Ait Sonuçların Değerlendirilmesi 80
5.1.1. Alkalen proteaz enzimi ve 5 mM $CuCl_2$'lü enzimin inaktivasyon kinetiklerinin incelenmesi 80
5.1.2. Alkalen proteaz enzimi ve 5 mM $CuCl_2$'lü enzimin otolizinin incelenmesi 83

KAYNAKLAR 84

EKLER 90

ÖZGEÇMİŞ 92

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Proteazların hidroliz reaksiyonunun mekanizması 6
Şekil 2.2. Serin proteazların (tripsin, kimotripsin ve elastaz) spesifisiteleri [35] 10
Şekil 2.3. Serin proteazların katalitik etki mekanizması [36] 11
Şekil 2.4. Tetrahedral geçiş hali ara ürününün yapısal özellikleri [36] 11
Şekil 2.5. Aspartil proteazların katalitik etki mekanizması [37] 13
Şekil 2.6. Sistein proteazların katalitik etki mekanizmaları [37] 14
Şekil 2.7. Metaloproteazların katalitik etki mekanizmaları [37] 15
Şekil 2.8. Tripsin'in üç boyutlu konformasyonel yapısı [43] 19
Şekil 2.9. Kimotripsin'in aktif bölge rezidüleri [44] 20
Şekil 2.10. v'ye karşı [S] diyagramı 28
Şekil 2.11. Lineweaver-Burk diyagramının görünüşü 28
Şekil 2.12. Farklı sıcaklıklarda ölçülen hız sabitinin lnk'ya karşı 1/T işaretlenmesiyle elde edilen E_a aktivasyon enerjisi. Enzimatik reaksiyonlar için $\ln(V_m/[E]_t)$ ya da $\ln V_m$'e karşı 1/T diyagramı da çizilebilir 30
Şekil 2.13. İnaktivasyon hız sabiti grafiği 31
Şekil 2.14. Gerçek olamayan aktivatör varlığında v'ye karşı [S] diyagramı 36
Şekil 2.15. Gerçek olmayan aktivasyon için Lineweaver-Burk diyagramı 36
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki $CuCl_2$ çözeltilerinin alkalen proteaz enzimi üzerine etkisi 52
Şekil 4.2. Alkalen proteazın 40, 45, 50, 55, 57.5, 60, 62.5 ve 65°C'lerde inaktivasyon kinetiği (Hammersten kazein substrat, her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9849'dur) 53
Şekil 4.3. Alkalen proteazın 45, 50, 55, 60 ve 65°C'lerde inaktivasyon kinetiği (Kazein substrat, her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9913'dür) 54
Şekil 4.4. *Bacillus clausii* alkalen proteazının termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjsinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius diyagramları, (A): Hammersten kazein substrat, (B): Kazein substrat (r değerleri ≥ 0.9746'dır) 56
Şekil 4.5. Alkalen proteazın 45ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9837'dir) 58
Şekil 4.6. Alkalen proteazın 50ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9685'dir) 59
Şekil 4.7. Alkalen proteazın 55ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9789'dir) 60
Şekil 4.8. Alkalen proteazın 60ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9889'dir) 61
Şekil 4.9. Alkalen proteazın 65ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9699'dir) 62
Şekil 4.10. *B. clausii* alkalen proteazın sıcaklık profili (A) ve Arrhenius aktivasyon enerji grafiği, her bir doğru için r ≥ 9879'dur (B) 64
Şekil 4.11. 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 45, 50, 55, 60 ve 65°C'lerde inaktivasyon kinetiği (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9855'dir) 66
Şekil 4.12. *Bacillus clausii* alkalen proteazının 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius diyagramı (r değeri 0.9947'dir) 67

Şekil 4.13. 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 45ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9907'dir)..... 68
Şekil 4.14. 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 50ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9912'dir)..... 69
Şekil 4.15. 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 55ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9974'dir)..... 70
Şekil 4.16. 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 60ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9889'dur)..... 71
Şekil 4.17. 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 65ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9894'dür)..... 72
Şekil 4.18. 5 mM Cu^{2+} içeren *B. clausii* alkalen proteazın sıcaklık profili (A) ve Arrhenius aktivasyon enerji grafiği, her bir doğru için r ≥ 9754'dür (B) 74
Şekil 4.19. 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın 45ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (iki doğrunun kesim noktasının y eksenindeki koordinatı 0.000028)..... 76
Şekil 4.20. 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın 50ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (iki doğrunun kesim noktasının y eksenindeki koordinatı 0.000025)..... 77
Şekil 4.21. 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın 55ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (iki doğrunun kesim noktasının y eksenindeki koordinatı 0.000040)..... 77
Şekil 4.22. 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın 60ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (iki doğrunun kesim noktasının y eksenindeki koordinatı 0.000040)..... 78
Şekil 4.23. 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın 65ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (iki doğrunun kesim noktasının y eksenindeki koordinatı 0.000060)..... 78
Şekil 4.24. Serbest enzimin değişik sıcaklıklardaki otokatalitik hidrolizi..... 80
Şekil 4.25. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin değişik sıcaklıklardaki otokatalitik hidrolizi..... 80

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Endüstriyel öneme sahip bazı alkalen proteazlar [3] 2
Tablo 1.2. Dünya çapındaki en büyük proteaz üreticileri [1] 2
Tablo 1.3. Deterjanlarda kullanılan subtilizin çeşitleri [6] 3
Tablo 2.1. Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması [33] 6
Tablo 2.2. Proteazların sınıflandırılması 7
Tablo 2.3. Katalitik bölgedeki işlevlerine göre peptidazlar 8
Tablo 4.1. *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazı üzerine değişik metal iyonlarının etkisi 51
Tablo 4.2. *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının farklı sıcaklıklardaki inaktivasyon hız sabitleri ve yarılanma ömrü (Hammersten kazein substrat) 53
Tablo 4.3. *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının farklı sıcaklıklardaki inaktivasyon hız sabitleri ve yarılanma ömrü (Kazein substrat) 55
Tablo 4.4. Alkalen proteazın termal inaktivasyonun termodinamik parametreleri (Hammersten kazein substrat) 57
Tablo 4.5. Alkalen proteazın termal inaktivasyonun termodinamik parametreleri (Kazein substrat) 57
Tablo 4.6. Alkalen proteazın 45°C'de K_m ve V_m değerleri 58
Tablo 4.7. Alkalen proteazın 50°C'de K_m ve V_m değerleri 59
Tablo 4.8. Alkalen proteazın 55°C'de K_m ve V_m değerleri 60
Tablo 4.9. Alkalen proteazın 60°C'de K_m ve V_m değerleri 61
Tablo 4.10. Alkalen proteazın 65°C'de K_m ve V_m değerleri 62
Tablo 4.11. *Bacillus clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının farklı sıcaklıklarda kazein hidrolizi için belirlenmiş kinetik parametreleri 63
Tablo 4.12. Alkalen proteaz enziminin Arrhenius aktivasyon enerjisi 63
Tablo 4.13. *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazı ile farklı sıcaklıklardaki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreler 65
Tablo 4.14. *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında farklı sıcaklıklardaki inaktivasyon hız sabitleri (k_i) ve yarı ömür değerleri ($t_{1/2}$) 66
Tablo 4.15: 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 45°C'de K_m ve V_m değerleri 68
Tablo 4.16. 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 50°C'de K_m ve V_m değerleri 69
Tablo 4.17. 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 55°C'de K_m ve V_m değerleri 70
Tablo 4.18. 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 60°C'de K_m ve V_m değerleri 71
Tablo 4.19. 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 65°C'de K_m ve V_m değerleri 72
Tablo 4.20. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının farklı sıcaklıklarda kazein hidrolizi için belirlenmiş kinetik parametreleri 73
Tablo 4.21. 5 mM $CuCl_2$ içeren B. clausii GMBAE 423 alkalen proteazının aktivasyon enerjisi 73
Tablo 4.22. 5 mM Cu^{2+} iyonu içeren alkalen proteazın termal inaktivasyonun termodinamik parametreleri 75
Tablo 4.23. 5 mM Cu^{2+} iyonu içeren alkalen proteazın farklı sıcaklıklardaki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreler 75
Tablo 4.24. Alkalen proteazın 5 mM $CuCl_2$ varlığında aktivasyonunun değişik sıcaklıklardaki kinetik parametreleri 79

Tablo 4.25. 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın sıcaklıklar için otokatalitik hidroliz hız sabitleri (k_i), yarılanma ömürleri ($t_{1/2}$) ve stabilizasyon faktörleri (SF) 79
Tablo 5.1. *Bacillus clausii* GMBAE 42 proteazının ticari proteazlar ile karşılaştırılması 84

SİMGELER DİZİNİ

E_a	: Aktivasyon enerjisi
pH	: Asitlik derecesi
Asp	: Aspartik asit amino asidi
v	: Başlangıç hızı
k_b	: Boltzman sabiti
dak	: Dakika
R	: Gaz sabiti
gr	: Gram
His	: Histidin amino asidi
k_i	: İnaktivasyon hız sabiti
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
Met	: Metionin amino asidi
K_m, V_m, k_{cat}	: Michaels Menten kinetik sabitleri
µg	: Mikro gram
µl	: Mikro litre
mg	: Miligram
ml	: Mili litre
mM	: Mili molar
M	: Molar
nm	: Nano metre
h	: Plank sabiti
k	: Reaksiyon hız sabiti
rpm	: Santrifüj rotorunun dakikadaki devir hızı
Ser	: Serin amino asidi
[S]	: Substrat konsantrasyonu
$[E]_t$	: Total enzim konsantrasyonu
U	: Ünite
$t_{1/2}$	: Yarı ömür süresi

Kısaltmalar

E	: Enzim
DEAE	: Dietilaminoetil
GMBAE	: Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü
MAM	: Marmara Araştırma Merkezi
BSA	: Sığır serum albumini
Spec	: Spektrofotometre
S	: Substrat
SEM	: Ortalamanın standart sapması
TÜBİTAK	: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu

Bacillus clausii GMBAE 42'den SAFLAŞTIRILAN ALKALEN PROTEAZIN TERMAL İNAKTİVASYON KİNETİĞİNİN BELİRLENMESİ ve Cu^{2+} İYONLARI ile TERMOSTABİLİZASYONU

Nurçin ÇELİK

Anahtar Kelimeler : *Bacillus clausii*, Alkalen proteaz, İnaktivasyon kinetikleri.

Özet : Bu çalışmada, *Bacillus clausii* GMBAE 42 serin alkalen proteazının termal inaktivasyonu üzerine Cu^{2+} iyonlarının koruyucu etkisi incelenmiştir. Enzime pH 10.5'da 50°C'de 1-10 mM konsantrasyonlarda $CuCl_2$ ilavesinde, optimum konsantrasyon 5 mM olarak bulunmuştur. Doğal enzimin ve 5 mM $CuCl_2$ içeren enzimin, inaktivasyon mekanizmalarının pH 10.5'da 45-65°C aralığında ön inkübasyonlar sırasında birinci dereceden inaktivasyon kinetiklerine uyduğu gözlenmiştir. 5 mM $CuCl_2$ içeren enzimin inaktivasyon hız sabitleri (k_i) doğal enzimden daha düşük ve yarı ömür zamanları ($t_{1/2}$) doğal enzimden daha yüksek bulunmuştur. 5 mM $CuCl_2$ içeren enzimin inaktivasyonunun aktivasyon serbest enerji (ΔG_i) değerleri çalışılan tüm sıcaklık değerlerinde doğal enziminkinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. 5 mM $CuCl_2$ içeren enzimin en yüksek kararlılığı pH 10.5'da 50°C'de 2.42 kat olarak gözlenmiştir. 5 mM $CuCl_2$ ilavesinden sonra elde edilen enzimin daha düşük K_m ve daha yüksek k_{cat} değerleri, enzimin katalitik performansı ve substrat afinitesi üzerine Cu^{2+} iyonlarının artırıcı etkisini göstermektedir.

DETERMINATION OF INACTIVATION KINETICS OF ALKALINE PROTEASE PURIFIED FROM *Bacillus clausii* GMBAE 42 and ITS THERMOSTABILIZATION by Cu^{2+} IONS

Nurçin ÇELİK

Keywords : *Bacillus clausii*, Alkaline protease, Inactivation kinetics.

Abstract : An investigation was carried out to evaluate the protective effect of Cu^{+2} ions on the thermal inactivation of an *Bacillus clausii* GMBAE 42 serine alkaline protease. Optimal concentration was found to be 5 mM after addition of $CuCl_2$ into enzyme solution at 1-10 mM concentrations. The inactivation mechanism of both native and containing 5 mM $CuCl_2$ enzyme appeared to obey first order inactivation kinetics during prolonged incubations at 45-65°C range and pH 10.5. Inactivation rate constants (k_i) of containing 5 mM $CuCl_2$ enzyme were always lower, and half-life times ($t_{1/2}$) were always higher than that of native enzyme. The activation free energy of inactivation (ΔG_i values) of 5 mM $CuCl_2$ containing enzyme were found to be always higher than that of native enzyme at all temperature values studied. Highest stability of 5 mM $CuCl_2$ containing enzyme was observed as 2.42 fold at 50°C and pH 10.5. Lower K_m and higher k_{cat} values of enzyme obtained after addition of 5 mM $CuCl_2$ indicates the improved effect of Cu^{2+} ions on the substrate affinity and catalytic performance of the enzyme.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Enzimler, katalitik özelliklere sahip proteinlerdir. Yüksek katalitik aktivite göstermeleri, yüksek derecede substrat spesifitesine sahip olmaları, büyük miktarlarda üretilebilmeleri ve ekonomik değere sahip olmaları açısından geleneksel kimyasal katalizörlerden üstün avantajlara sahiptirler. Enzimlerin yapı fonksiyonlarını, kataliz mekanizmalarını ve enzimlerin katalizlediği her türlü metabolik ve biyokimyasal reaksiyonların neden ve nasıl gerçekleştiğini inceleyen, enzimolojinin başlangıcı 19. y.y'dan daha önceki tarihlere dayanır. Fakat önemli bilimsel gelişmeler son 40 yılda gerçekleşmiştir. Pepsin, polifenol oksidaz, peroksidaz ve invertaz gibi enzimler 19.y.y'ın ortalarında, diğer enzimler ise 19. y.y'ın sonlarına doğru bulunmuştur.

Günümüzde enzimler pek çok ticari prosesde kullanılmaktadır. Ticari olarak kullanılmakta olan enzimlere örnek olarak peynir üretiminde peynir mayası olarak kullanılan renin, biracılıkta kullanılan papain, tekstil ve gıda endüstrisinde kullanılan amilaz, gıda endüstrisinde kullanılan invertaz ve pektinaz ile farmasötik endüstride kullanılan penisilin asilaz gösterilebilir.

Endüstride kullanılan enzimlerin % 75'i hidrolitik enzimlerdir, proteazlarda bu %75'lik kısımda yer alan üç büyük gruptan birini oluştururlar [1]. Proteazlar, diğer bir adı ile proteolitik enzimler hedefledikleri proteinlerdeki peptid bağlarını hidrolizleyen hidrolitik enzimlerdir. Bu enzimlerin değişik kaynaklardan izole edilen bazı sınıfları nötral pH'nın üzerindeki ekstrem pH değerlerinde de kataliz yeteneğine sahip olmaları sebebi ile endüstriyel kullanımda önem kazanmalarına sebep olmuştur. 1994 yılında 400 milyon $ olan toplam endüstriyel enzim pazarının 112 milyon $'lık kısmını deterjan katkıları olarak proteazlar oluşturmuştur [2]. Proteazlar deterjan, protein, fırıncılık, et, fotografik, deri ve süt endüstrisinde kullanılmaktadır ve yakın geçmişte alkalen proteazların endüstriyel katalizörler olarak kullanılmasında önemli bir artış gerçekleşmiştir. Deri endüstrisinde, tüy giderme işlemlerinde proteazların kullanılması ile birlikte deri endüstrisindeki toksik

kimyasalların kullanımını da önemli ölçüde azaltmıştır [3]. Alkalen proteazların diğer endüstriyel kullanımları arasında da amino asitlerin rasemik karışımlarının ayrılması, peptid sentezi, X-ray filmlerinden jelatin tabakalarının hidroliziyle gümüşün geri kazanılması yer alır. Alkalen proteazların başarılı ticari uygulamalarına örnekler tablo 1.1.'de verilmiştir [3]. Dünya çapındaki en büyük proteaz üreticileri ise tablo 1.2.'de verilmiştir [1].

Tablo 1.1: Endüstriyel öneme sahip bazı alkalen proteazlar [3]

Üreten mikroorganizma	**Kökeni**	**Optimum pH/stabilite**	**Endüstriyel Uygulamalar**
Streptococcus sp.	Bakteri	8.0	Süt / peynir üretimi
Bacillus stearothermophilus	Bakteri	9.5	Deterjenlar ve çamaşır tozları
Tritirachium album (Proteinaz T)	Fungal	9.0-12.0	Çamaşır deterjanları formülasyonları
Tritirachium album (Proteinaz R)	Fungal	7.0-10.0	Çamaşır deterjanları formülasyonları
Conidiobolus coronatus (alkali proteinaz B)	Fungal	9.7	D,L fenilalanin ve glisin rasemik karışımlarının ayrılmasında
Bacillus sp. Y. (BYA)	Bakteri	10.0-12.5	Deterjan formülasyonları
Bacillus lichenformis (alkalaz)	Bakteri	8.2	N-ucu korunmuş amino asitlerin katalizi
Bacillus sp.(AH-101)	Bakteri	12.0-13.0	Tüy giderme / deri endüstrisi
Conidiobolus coronatus (NCI 86.8.20)	Fungal	8.5	Ticari deterjanlar
Bacillus firmus	Bakteri	8.0	Deterjan endüstrisi
Bacillus sp. (P-001A)	Bakteri	9.5	Doğal atıklardan biyokütle üretimi
Bacillus sp.	Bakteri	8.5	Tüy giderme / deri endüstrisi
Bacillus sp.(Savinaz/Durazim)	Bakteri	9.0-11.0	Deterjan formülasyonları
Bacillus lichenformis (alkalaz)	Bakteri	8.2	Biyolojik aktif peptidlerin sentezi
Bacillus subtilis	Bakteri	8.5	Deri endüstrisinde banyo ajanları
Amycolata / Amycolatopsis	Bakteri	8.0-11.0	Peynir ve deterjanlar

Tablo 1.2: Dünya çapındaki en büyük proteaz üreticileri [1]

Şirket	**Ülke**	**Pazar payı (%)**
Novo Industries	Danimarka	40
Gist-Brocades	Hollanda	20
Genencor International	Amerika	10
Miles Laboratories	Amerika	10
Diğer		20

Deterjan endüstrisinde proteaz kullanımı fikri, 1913'de Roehm tarafından pankreatik ekstraktların kullanımıyla başlamıştır. 1960'larda bakterilerden üretilen enzimler daha ekonomik olarak endüstride kullanıma başlanmıştır. Endüstriyel alanda kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün

oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir [4]. Proteaz enzimi *Bacillus* cinsine ait alkalifilik mikroorganizmalar tarafından bol miktarda üretilir. Bu sebeple alkalifilik *Bacillus* suşları hem endüstriyel uygulamalar hem de akademik çalışmalar açısından önemlidirler [5]. *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus licheniformis* ile başlayan *Bacillus* türlerinden elde edilen alkalen proteazlar, subtilizinler için öncü moleküller olarak gösterilmiştir. Günümüzde dünya çapında, 15'e yakın farklı enzim molekülleri deterjanlarda kullanılmaktadır. Deterjanlarda kullanılan subtilizin çeşitleri tablo 1.3.'de verilmiştir [6].

Tablo 1.3: Deterjanlarda kullanılan subtilizin çeşitleri [6]

Ticari marka	**Üretici**	**Orijin**	**WT/ PE[c]**	**Üretim türü**	**Sinonimi**
Alcalase®	Novozymes	*B. licheniformis*	WT	*B. licheniformis*	Subtilisin Carlsberg
FNA[a]	Genencor	*B. amyloliquefaciens*	PE	*B. subtilis*	
Savinase®	Novozymes	*B. clausii*	WT	*B. clausii*	Subtilisin 309
Purafect™	Genencor	*B. lentus*	WT	*B. subtilis*	
KAP[b]	Kao	*B. alkalophilus*	WT	*B. alkalophilus*	
Everlase™	Novozymes	*B. clausii*	PE	*B. clausii*	
Purafect OxP™	Genencor	*B. lentus*	PE	*B. subtilis*	
FN4[a]	Genencor	*B. lentus*	PE	*B. subtilis*	
BLAP S[b]	Henkel	*B. lentus*	PE	*B. licheniformis*	
BLAP X[b]	Henkel	*B. lentus*	PE	*B. licheniformis*	
Esperase®	Novozymes	*B. halodurans*	WT	*B. halodurans*	Subtilisin 147
Kannase™	Novozymes	*B. calusii*	PE	*B. calusii*	
Properase™	Genencor	*B. alkalophilus PB92*	PE	*B. alkalophilus*	

[a] Spesifik müşteriler için özel moleküller, [b] Tutsak kullanımı için özel moleküller, [c] PE,protein mühendisliği, WT,yabani tip

Alkalifilik ve termofilik mikroorganizmalardan özellikle deterjan endüstrisinin kullanımına yönelik enzimlerin üretimine ilişkin çalışmalarda da son yıllarda artış görülmektedir [7, 8, 9, 10, 11, 12, 14]. Diğer taraftan bu organizmalardan ilgili enzimler saflaştırılmakta ve karakterizasyonları rapor edilmektedir [15, 16, 17, 18]. Alkalifilik *Bacillus* türlerinden elde edilen alkalen proteaz biyoteknolojik uygulamalarda önemli oranda potansiyel oluşturur [8, 19, 20, 21, 22, 23]. Son yıllarda ülkemizde özellikle serin alkalen proteaz üretimine yönelik "metabolik akış" analizlerini de içeren nitelikli çalışmalar yayınlanmıştır [24, 25, 26, 27, 28, 29, 30].

Günümüzde deterjan endüstrisinde, yıkama sıcaklığının düşürülmesi ve deterjan kompozisyonunun değiştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmakta, fosfat tabanlı

deterjanları uzaklaştırarak, deterjan uygulamaları için daha uygun yeni proteazlar üzerinde durulmaktadır [31].

BÖLÜM 2. PROTEOLİTİK ENZİMLER (PROTEAZLAR)

2.1. Giriş

Enzimler, biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler proteindirler. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü düzenler ve çoğu kez hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonunun sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa ya da alt birimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur. Bu sebeple protein enzimlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı katalitik aktivite için esastır.

Enzimler salgılanma şekillerine göre 2 ana sınıfa ayrılmıştır. Hücre içi enzimler, sitoplazmaya dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler. Genelde bu enzimlerin substratları şekerler, aminoasitler, karboksilik asit gibi küçük molekül ağırlığına sahip, hücre zarından geçebilme yeteneği olan moleküllerdir [32]. Hücre dışı enzimler, besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanır. *Escherichia coli* gibi gram-negatif bakterilerde proteinler iç ve dış membran arasındaki periplazmik boşluk arasında kalırlar. Çünkü gram-negatif bakteri duvarları, gram-pozitif bakterilerde bulunmayan bir dış membrana sahiptir. Bu yüzden gram pozitif bakterilerde enzimler direkt besiyerine salgılanır. Çoğu değişken hücre içi enzimlerin aksine, hücre dışı enzimlerin kararlılığı (stabilitesi) yüksek olup, çevre koşullarında aktivitelerini uzun süre koruyabilirler [32].

Enzimler katalizledikleri tepkimelere göre altı temel sınıfa ayrılırlar (Tablo 2.1) [33]. Her enzime, katalizlediği tepkimeyi tanımlayan dört sayılı bir sınıflandırma numarası ve sistematik bir ad verilir [33].

Tablo 2.1: Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması [33]

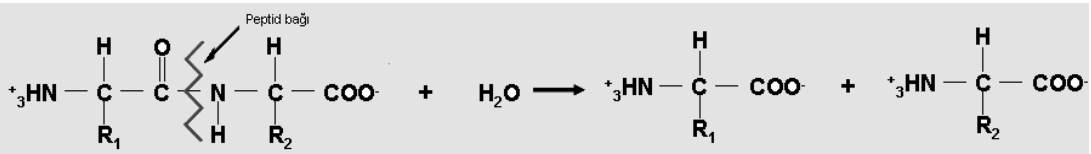
No.	Sınıf	Katalizlenen tepkime tipi
1	Oksidoredüktazlar	Elektronların transferi (hidrit iyonları ve H atomları)
2	Transferazlar	Grup-transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri (işlevsel grupların suya transferi)
4	Liyazlar	Çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değiştirmesiyle çift bağların oluşması
5	İzomerazlar	İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferi
6	Ligazlar	ATP'nin ayrılmasıyla eşleşmiş kondensasyon tepkimeleriyle C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması

Enzimler *in vitro* koşullarda da katalitik aktivite gösterdiklerinden, mikroorganizmaların bu proteinleri bol miktarda üretmeleri sonucu izole edilerek çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilirler. Enzimlerin bu şekilde endüstriyel süreçlerde kullanılmaları işlemleri topluca enzim teknolojisi olarak adlandırılır.

Enzim teknolojisi, mikrobiyal işlemler (üretici suşların seçimi, geliştirilmesi vb.), enzimlerin fermentasyon yoluyla üretimleri (büyük ölçekte üretimi için yapılan besiyeri, ortam koşulları vb. düzeylerdeki optimizasyonlar), katalitik etkinliğin arttırılması için enzimlerin üç boyutlu yapılarının değiştirilmesi (protein mühendisliği), izolasyonları ve immobilizasyonları (enzimlerin çözünmeyen destek materyaller yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmesi) çalışmalarını kapsar.

2.2. Proteazlar

Proteolitik enzimler veya proteazlar, proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Proteazların hidroliz reaksiyonunun mekanizması

Proteazlar, sınıf 3 (hidrolazlar) ve alt sınıf 3.4 (peptidazlar ya da peptid hidrolazlar) enzimleridirler. Proteazlar, endopeptidazlar ya da proteinazlar ve ekzopeptidazlar olarak ayrılan geniş bir familyayı oluştururlar. Proteazlar, doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynamaktadır ve böylece

besin döngüsünü sağlamakta ve ayrıca bitkilerin besinleri alabilmelerini sağlamaktadır [34].

2.2.1. Proteazların sınıflandırılması

Proteazlar, hidrolazlar sınıfında yer alan enzimler olup 4 alt gruba ayrılırlar. Bununla birlikte sahip oldukları geniş etki ve yapı çeşitlilikleri dolayısıyla da enzimlerin sınıflandırıldığı genel sistem ile sınıflandırılmaları da güçtür. Proteazlar kaynağına, aktif bölgedeki fonksiyonel gruplarına ve katalitik bölgedeki işlevlerine göre üç ana kriter temel alınarak sınıflandırılırlar (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: Proteazların sınıflandırılması

1. **Kaynağına göre proteazlar**
   - 1.1. Bitkisel proteazlar
   - 1.2. Hayvansal proteazlar
   - 1.3. Mikrobiyal proteazlar
2. **Aktif Bölgedeki fonksiyonel gruplarına göre proteazlar**
   - 2.1. Serin proteazlar
   - 2.2. Sistein proteazlar
   - 2.3. Aspartil proteazlar
   - 2.4. Metalo proteazlar
3. **Katalitik bölgedeki işlevlerine göre proteazlar**
   - 3.1. Ekzo peptidazlar
     - 3.1.1. Aminopeptidazlar
     - 3.1.2. Karboksi peptidazlar
       - 3.1.2.1 Serin tipi
       - 3.1.2.2. Sistein tipi
       - 3.1.2.3. Metalo tipi
   - 3.2. Endo peptidazlar
     - 3.2.1 Serin proteazlar
     - 3.2.2 Sistein proteazlar
     - 3.2.3 Aspartil proteazlar
     - 3.2.4 Metalo proteazlar

Proteazlar, katalizlediği reaksiyonlarla ekzopeptidaz ve endopeptidaz olmak üzere 2 alt sınıfa ayrılır. Exopeptidazlar, substratın amino yada karboksi ucuna yakın peptid

bağını ayırırlar. N ya da C ucundaki işlev bölgesine göre iki gruba ayrılırlar. Ekzopeptidazlar katalitik mekanizma temeline göre de sınıflandırılırlar (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3: Katalitik bölgedeki işlevlerine göre peptidazlar

Peptidazlar	**Alt Sınıf**
Ekzopeptidaz (Karboksipeptidaz)	
Serin-tip karboksipeptidazlar	3.4.16
Metallo karboksipeptidazlar	3.4.17
Sistein- tip karboksipeptidazlar	3.4.18
Endopeptidaz	
Serin endopeptidazlar	3.4.21
Sistein endopeptidazlar	3.4.22
Aspartik endopeptidazlar	3.4.23
Metalloendopeptidazlar	3.4.24
Katalitik mekanizması bilinmeyen endopeptidazlar	3.4.99

Amino peptidazlar, polipeptid zincirinin serbest bir N ucunda işlevseldir ve tek bir amino asit rezidüsünü, bir dipeptidi yada bir tripeptidi ayırır. Amino peptidazların N-terminal Met'i uzaklaştırdığı bilinir. Bakteri ve fungus içeren mikrobiyal türlerin geniş bir çeşidinde bulunurlar. Genellikle hücre içi enzimlerdir fakat *A. oryzae* tarafından üretilen aminopeptidaz hücre dışı enzimdir. Bakteri ve fungustan üretilen aminopeptidazların substrat spesifisiteleri hidroliz ürünlerinin profilleri temel alındığında farklı olabilir. Örneğin, *E.coli*'den üretilen aminopeptidaz I büyük bir proteazdır (400000 Da). Optimum pH'sı 7.5-10.5 arasındadır ve optimum aktivite için Mg^{2+} ya da Mn^{2+}'ya ihtiyaç duyarlar. *Bacillus licheniformis* aminopeptidazın ise, molekül ağırlığı 34000 Da'dur ve aktivitesi Co^{2+} iyonları varlığında artar. Diğer taraftan, *B. stearothermophilius* aminopeptidaz II bir dimerdir ve molekül ağırlığı 80000-100000 Da arasında olup, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} iyonları tarafından aktive olur [1].

Karboksi peptidazlar, polipeptid zincirinin C ucunda işlevseldir ve tek bir amino asit ya da bir dipeptidi ayırırlar. Karboksi peptidazlar enzimlerin aktif bölgesindeki amino asit rezidülerinin yapısına göre üç gruba ayrılırlar. *Penicillium spp., Saccharomyces spp.* ve *Aspergillus spp.*'den izole edilen serin karboksipeptidazların

substrat spesifisiteleri aynıdır fakat optimum pH, stabilite, moleküler ağırlık ve inhibitörlerin etkisi gibi diğer özellikleri farklıdır. *Saccharomyces spp.,* ve *Pseudomonas spp.*'den izole edilen metalo karboksipeptidazlar aktiviteleri için Zn^{2+} ya da Co^{2+} iyonuna ihtiyaç duyarlar. Sistein karboksipeptidazlar, aktif bölgelerinde sistein rezidüleri içerirler [1].

Endopeptidazlar**,** peptid zincirinin N- ve C- terminal uçları dışında zincirin iç bölgelerindeki peptid bağlarına etki etmeleri ile karakterize edilirler. Serbest amino ya da karboksil grubunun varlığı enzimatik aktivite üzerine negatif etki yaratır. Katalitik etki mekanizmalarını göz önüne alınarak serin, sistein, aspartil ve metalo proteaz olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Ayrıca endopeptidazlar substrat tercihlerine göre 3 sınıfta toplanırlar, Tripsin benzeri serin proteazlar, pozitif yüklü rezidüden sonraki peptid bağını hidrolizlerler, Kimotripsin benzeri serin proteazlar, büyük hidrofobik rezidüden sonraki peptid bağını hidrolizlerler, Elastaz benzeri serin proteazlar, küçük hidrofobik rezidüden sonraki peptid bağını hidrolizlerler [1].

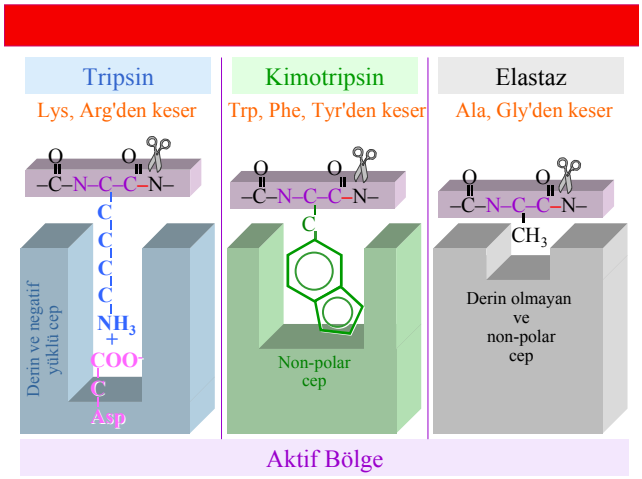
Serin endopeptidazlar katalitik işlemde aktif bölge merkezinde serin, sistein tip peptidazlar aktif merkezde sistein içerir. Aspartik endopeptidazlar katalitik bölgesinde katalitik aktiviteleri için iki aspartik aside ihtiyaç duyar. Metalo endopeptidazlar, katalitik mekanizmasında yaygın olarak çinko veya metal iyonlarını kullanırlar. Bir kısım endopeptidaz ise henüz katalitik aktivite mekanizması tanımlanamadığı için yukarıda belirtilen grupların dışında EC 3.4.99 alt sınıfında listelenmiştir.

2.2.2. Katalitik mekanizmalarına göre proteazlar

Proteazlar katalitik etki mekanizmaları göz önüne alarak serin, sistein, aspartil ve metalo proteazlar olmak üzere 4 ana gruba ayrılır [1].

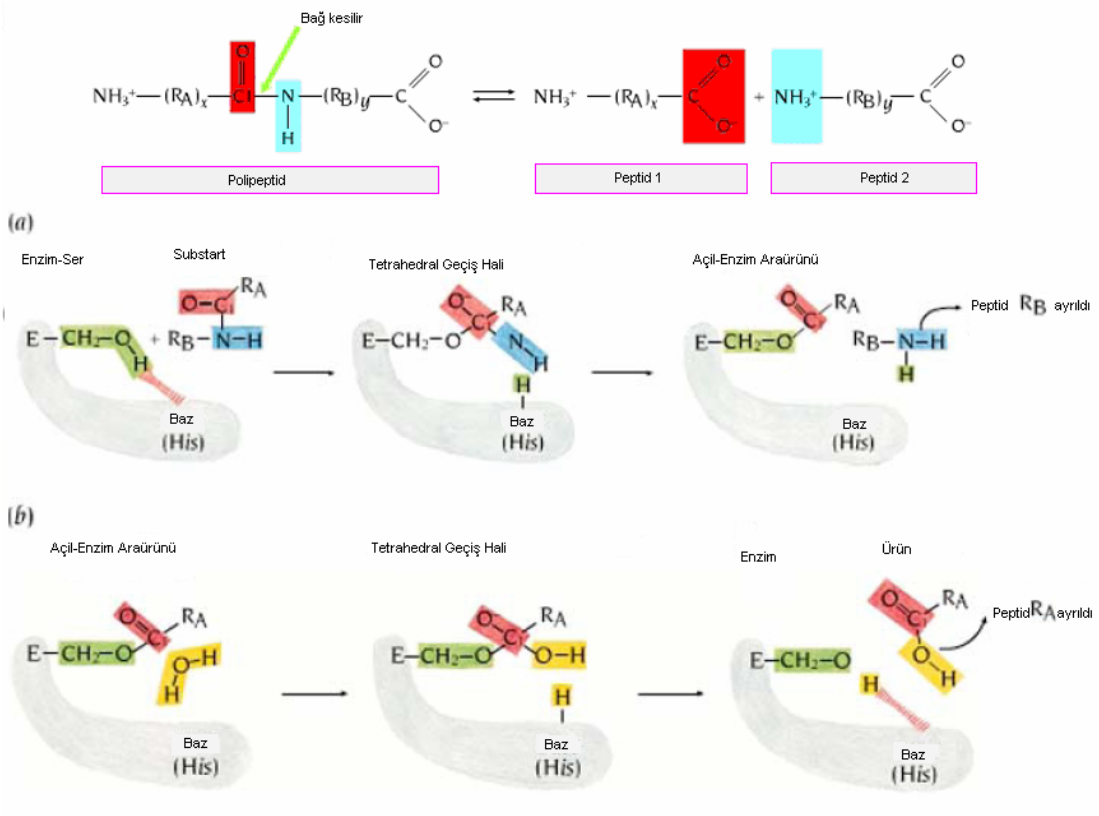
Serin proteazlar (EC 3.4.21), Kimotripsin, tripsin ve elastaz gibi enzimleri içeren kimotripsin tip ve subtilisin gibi bakteriyel enzimleri içeren subtilisin tip olmak üzere 2 farklı grupta incelenir. Serin proteazların spesifisiteleri şekil 2.2'de gösterilmiştir. Bu iki grubun, katalitik mekanizmaları ve aktif bölge yapıları aynı olmasına rağmen,

genelde 3 boyutlu yapıları farklıdır. Katalitik bölgede katalizden sorumlu amino asitler His^{57}, Asp^{102} ve Ser^{195}'dir (Katalitik triad).

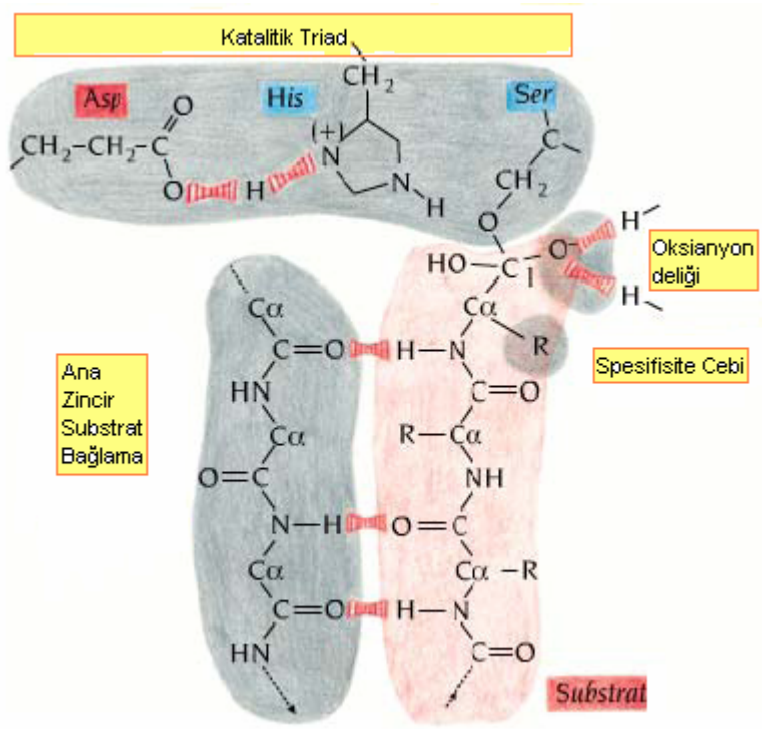


Şekil 2.2: Serin proteazların (tripsin, kimotripsin ve elastaz) spesifisiteleri [35]

Serin proteazlar iki basamaklı reaksiyon ile hidroliz işlemini gerçekleştirirler. Kovalent olarak bağlanmış enzim-peptid ara ürün üzerinden yürüyen reaksiyon amino asit yada peptid parçasının kaybı ile sonuçlanır. Açilasyon basamağını suyun ara ürüne karşı nükleofilik atağı ile gerçekleşen deaçilasyon basamağı izler ve reaksiyon peptidin hidrolizi ile sonuçlanır. Kataliz reaksiyonundaki ilk basamak, serin ile substrat arasında açil enzim ara ürününün oluşumudur. Bunu takiben negatif yüklü tetrahedral geçiş hali oluşur ve peptid bağı ayrılır. İkinci aşamada oluşan açil enzim ara ürünü bir su molekülü ile hidrolizlenerek, peptidin ayrılması ile serin-hidroksil tekrar oluşur (Şekil 2.3). Tetrahedral geçiş hali ara ürününün yapısal özellikleri şekil 2.4'de gösterilmiştir. Ser^{195}, Asp^{102}'ye hidrojen bağıyla bağlanan His^{57}'ye hidrojen bağıyla bağlıdır. Ser^{195} oksijeni bir peptid bağındaki karbonil karbonunu hedef aldığında hidrojen bağlı His^{57} serin protonunu uzaklaştırmak için genel bir baz gibi davranır ve negatif yüklü Asp^{102}, His^{57} rezidüsünde oluşan pozitif yükü stabilize eder. Ser^{195} oksijeni substratın karbonil karbonuna saldırdıkça negatif yük kazanmış karbonil oksijeninin çok kısa ömürlü bir ara ürünü oluşur. Bu yük oksianyon deliği denilen enzimdeki bir paket içerisinde oluşur ve bu enzimin omurgasındaki iki peptid bağının amid azotlarının katkıda bulunduğu hidrojen bağlarıyla stabilize edilir. Spesifisite cebinin büyüklüğü ve yapısı, C1 rezidüsü için proteaz spesifisitesini belirlemeye yardım eder [36].



Şekil 2.3: Serin proteazların katalitik etki mekanizması [36]



Şekil 2.4: Tetrahedral geçiş hali ara ürününün yapısal özellikleri [36]

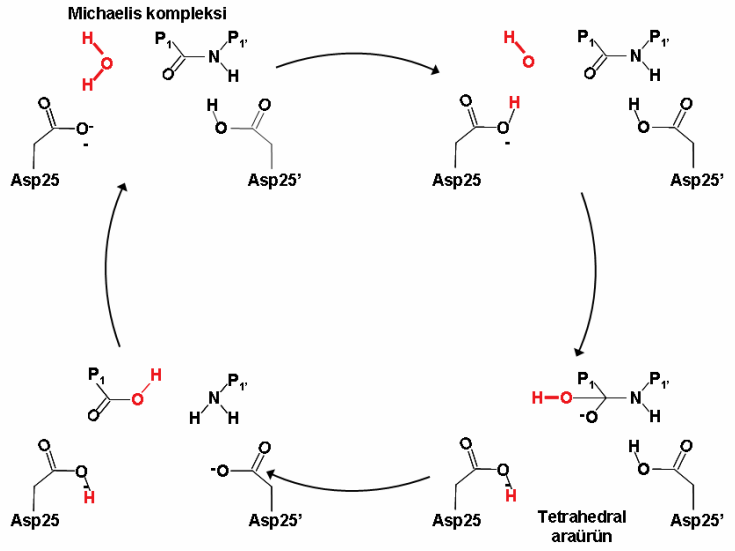
Serin proteazlar, aktif bölgesinde bir serin grubunun varlığıyla karakterize edilirler. Endopeptidaz, exopeptidaz, oligopeptidaz ve omegapeptidaz gruplarında bulunurlar. Serin proteazların en tipik inhibitörü fenilmetilsülfonilflorür (PMSF) olmakla birlikte, di-izopropilflorofosfat (DFP), tosil-L-lizin klorometil keton (TLCK), 3,4-dikloroizokumarin (3,4-DCI) gibi inhibitörler tarafından da irreversible inhibisyona uğratılırlar. Serin proteazların bazıları p-kloromerküribenzoat (PCMB) gibi tiyol ayıraçları tarafından da inhibe edilirler. Genellikle nötral ve alkalen pH değerlerinde aktiftirler ve pH 7-11 arasında optimum aktivite gösterirler. Esterolitik ve amidaz aktivitesi içeren geniş substrat spesifisitesine sahiptirler. Molekül ağırlıkları 18-35 kDa arasındadır. İzoelektrik noktaları genellikle pH 4-7 arasındadır.

Serin alkalen proteazlar, Serin proteazların en geniş alt grubunu temsil ederler ve yüksek alkalen pH'da aktiftirler. Bakteri, maya, mantar ve küflerden üretilirler. Bu enzimler DFP ya da bir patates proteaz inhibitörü tarafından inhibe olurlar, fakat tosil-L-fenilalanin klorometil keton (TPCK) ya da TLCK tarafından inhibe olmazlar. Substrat spesifisiteleri aynıdır fakat kimotripsinden daha az zordur. Peptid bağını tirozin, fenilalanin ya da lösinin karboksil ucundan hidrolizlerler. İzoelektrik noktaları pH 9 civarındadır. Moleküler ağırlıkları 15-30 kDa aralığındadır. *Arthrobacter, Streptomyces* ve *Flavobacterium spp.* gibi bazı bakterileri türleri tarafından da üretilirler.

Subtilizinler, serin proteazların *Bacillus* orijinli ikinci büyük sınıfını oluşturmaktadırlar. Subtilizin Calsberg ve subtilizin Novo ya da bakteriyel proteaz Nagase (BPN') olarak iki farklı tipte tanımlanmışlardır. *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen subtilizin Calsberg, Calsberg laboratuvarında Ottesen, Lang ve Linderstrom tarafından 1947'de keşfedilmiştir. Subtilizin Calsberg deterjanlarda yaygın olarak kullanılır. Subtilizin Novo *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilmektedir. Subtilizin BPN' ticari olarak daha az öneme sahiptir. Her iki subtilizinin molekül ağırlığı 27.5 kDa olup 58 amino asitlik farkla biri diğerinden ayrılır. 60°C optimal sıcaklık ve optimum pH 10 gibi benzer özelliklere sahiptirler. Her iki enzim de geniş bir substrat spesifisitesine ve Ser^{221}, His^{64} ve Asp^{32}'den oluşan aktif-bölge triadına sahiptir [1].

Proteazlar serin proteaz (EC 3.4.21), sistein proteaz (EC 3.4.22), aspartil proteaz (EC 3.4.23) ve metallo proteaz (EC 3.4.24) olmak üzere deterjan, gıda ve deri endüstrisinde kullanılan endüstriyel enzimlerin en önemli gruplarından birini oluştururlar.

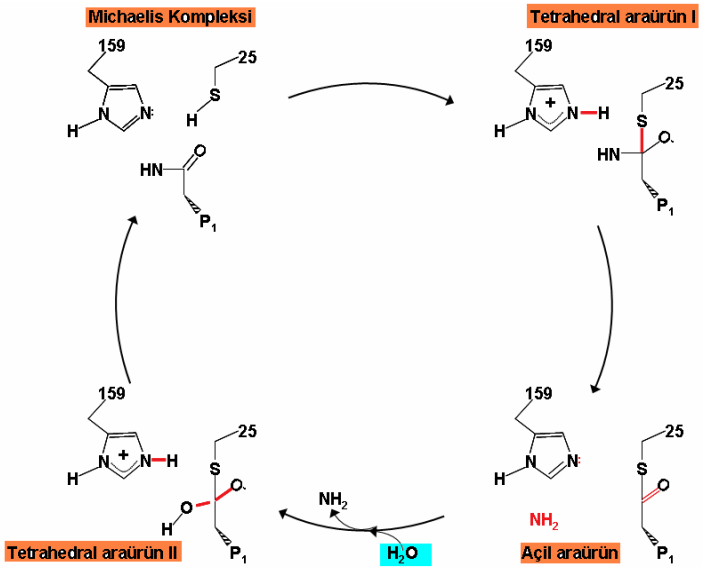
Aspartil proteazlar (EC 3.4.23), katalitik aktiviteleri için aspartik asit rezidüsüne bağlı endopeptidazlardır. Başlıca pepsin (A1), retropepsin (A2) ve pararetrovirüslerden elde edilen enzimler (A3) olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Genel olarak düşük pH'da (pH 3-4) maksimum aktivite gösterirler ve pH 3-4.5 arasında izoelektrik noktasına sahiptirler. Molekül ağırlıkları 30-45 kDa arasındadır. Pepstatin tarafından inhibe olurlar. Mikrobiyal aspartil proteazlar, *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus* ve *Neurospora*'dan üretilen pepsin benzeri enzimler ve *Mucor spp.* ve *Endothia* tarafından üretilen renin benzeri enzimler olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Aspartil proteazlar tarafından proteinlerin hidrolizi mekanizması için genel baz katalitik mekanizması önerilmiştir. Aspartil proteaz tarafından genel asit-baz mekanizması ile gerçekleştirilen ve suyun direkt olarak reaksiyona katıldığı hidroliz reaksiyonunun mekanizması şekil 2.5'de verilmiştir [1].



Şekil 2.5: Aspartil proteazların katalitik etki mekanizması [37]

Sistein proteazlar, prokaryot ve ökaryotların her ikisi tarafından üretilirler. Yaklaşık 20 sınıfı tanımlanmıştır. Hepsinin aktivitesi sistein ve histidin içeren katalitik triada

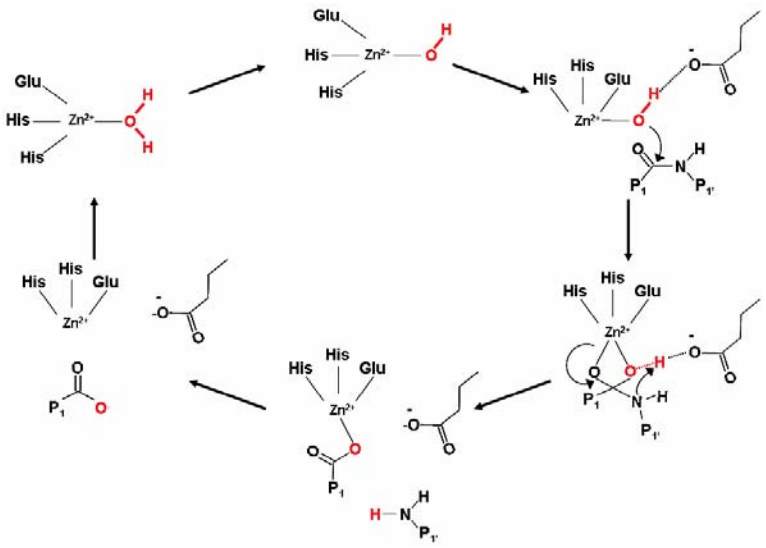
bağlıdır. Cys ve His rezidülerinin dizilişi sınıflar arasında farklıdır. Genellikle sistein ve HCN gibi indirgeyici ajanlar varlığında aktiftir. Yan zincir spesifisitesine göre, Papain benzeri, Tripsin benzeri, Glutamik aside spesifik ve diğerleri olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Genellikle birkaçı hariç (lizozomal proteazlar asidik pH'da maksimum aktivite gösterirler) nötral pH'da optimuma sahiptirler. Sistein proteazlar açil-tiyol ara ürününün hidrolizlendiği genel asit-baz oluşumunu gerektiren iki yer değiştirme reaksiyonunun gerçekleştiği hidroliz mekanizması ile karboksilik asit türevlerini hidrolizlerler. Bu sebeple sistein proteazların etki mekanizması serin proteazların etki mekanizmasına çok benzerdir. Katalitik prosesin ilk basamağı serbest enzim ile substratın kompleks formda nonkovalent bağlanmasını gerektirir. Bu basamağı enzimin açilasyonu izler ve ilk ürün R'-NH_2 oluşur ve ayrılır. Takip eden deaçilasyon basamağında açil-enzim kompleksi su molekülü ile tepkir ve ikinci ürün ayrılır serbest enzimin rejenerasyonu gerçekleşir. Sistein proteazların katalitik etki mekanizmaları şekil 2.6'da gösterilmiştir [1].



Şekil 2.6: Sistein proteazların katalitik etki mekanizmaları [37]

Metalo proteazlar, aktiviteleri için iki değerlikli bir metal iyonuna gereksinim duymalarıyla karakterize edilirler. Yaklaşık otuz sınıfı tanımlanmıştır. Bunların onyedisi yalnızca endopeptidaz, onikisi yalnızca exopeptidaz, biri hem endo hem de exopeptidaz içerirler. İşlev spesifisitelerine göre Nötral, Alkalen, *Myxobacter* I ve *Myxobacter* II olmak üzere dört gruba ayrılırlar [1].

Alkalen metaloproteazlar çok geniş bir spesifisite gösterirken, nötral metaloproteazlar hidrofobik amino asitlere spesifisite gösterirler. *Myxobacter* I, ayrılan bağın her iki tarafındaki küçük amino asit rezidülerine spesifik iken, *myxobacter* II peptid bağının amino tarafındaki lizin rezidülerine spesifiktir. Genellikle EDTA gibi şelatlayıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar. Termolizin bir nötral metaloproteazdır, *B. stearothermophilus* tarafından üretilirler, disülfit köprüleri dışında tek bir peptiddirler ve moleküler ağırlıkları 34 kDa'dur, 80°C'de 1 saat yarılanma ömrüyle çok kararlı bir proteazdır. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia spp.* tarafından üretilen alkalen metaloproteazlar 48-60 kDa moleküler ağırlığa sahiptirler ve pH 7-9 arasında aktiftirler. Matriks metaloproteazlar, doku morfogenezi, faklılaşması sırasında hücre dışı matriks degredasyonunda önemli bir rol oynarlar ve kanser ve arthritis gibi hastalıkların tedavisinde yararlı olabilirler. Metalloproteazların etki mekanizması aspartik ve sistein proteazın etki mekanizmasından keskin farklılıklar gösterir. Bu enzimler aktivite gösterebilmek için iki değerlikli metal iyonlarının varlığına ihtiyaç gösterirler ve şelat yapıcı ajan ilavesi ya da diyaliz ile inaktive edilebilirler. Metaloproteazların katalitik etki mekanizmaları şekil 2.7'de gösterilmiştir [1].



Şekil 2.7: Metaloproteazların katalitik etki mekanizmaları [37]

2.2.3. Proteazların fizyolojik işlevleri

Tüm canlı hücreler proteinlerin sentezi ve degredasyonunun sürekliliği ile belirli bir protein dönüşüm oranını korur. Hücre içi proteazlar hücrede uygun protein

dönüşümü yapmaya katkısıyla bilinirler. *E.coli*'de, *lon* geni tarafından üretilen ATP-bağlı proteaz La, anormal proteinlerin hidrolizinden sorumludur.

Bakterilerde sporların, mayalarda asko sporların, cıvık mantarlarda spor yapıların oluşumu ve funguslarda konidial boşalım, bunların hepsi güçlü protein dönüşümü içerir. Sporlaşma için bir proteaz gereksinimi proteaz inhibitörlerinin kullanımıyla kanıtlanmıştır. Maya diploidlerinde asko spor oluşumunun proteaz A aktivitesindeki artışa bağlı olduğu gösterilmiştir.

Enzimlerin proteolitik inaktivasyonu hücre içi katalitik aktivitenin irreversible kaybına neden olur ve fizyolojik olarak önemli bir olaydır.

Proteazlar, büyük polipeptidlerin daha küçük peptidlere ve amino asitlere hidrolizine yardımcı olurlar, böylelikle onların hücre tarafından absorpsiyonunu kolaylaştırırlar. Hücre dışı enzimler, onların depolimerleşme aktivitesinden dolayı beslenmede büyük bir rol oynar.

Proteazlar aracılığıyla gen ekspresyonunun modulasyonu kanıtlanmıştır. *Bacillus thuringiensis* RNA polimerazın β alt biriminin transkripsiyonel spesifisitesindeki bir değişme onun proteolitik modifikasyonuyla düzeltilir [1].

2.2.4. Proteaz kaynakları

Proteazlar yaşayan organizmalar için fizyolojik olarak gerekli olduklarından bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi kaynaklardan geniş bir dağılım ile elde edilirler. Bundan dolayı proteazlar kaynağına göre, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olmak üzere üç farklı grupta incelenirler.

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılmasını, bitkinin yetiştiği iklim koşulları ve kültivasyon toprağının uygunluğu gibi farklı faktörler belirler. Bunun yanında bitki tarafından proteazın üretilmesi zamana bağlı bir süreçtir. Papain, bromelain, keratinaz ve fisin en iyi bilinen bitki kaynaklı proteazlardır.

Papain kaynağı olan Papaya bitkisi ile ilgili araştırmalar, tropikal bölgelerde yaşayan bazı yerli halkın eti pişirmeden önce bu bitkinin yapraklarına sarmaları ve böylece etin daha iyi pişeceği ve sindirileceği yönündeki inançlarının bazı bilim adamlarının dikkatini çekmesi sonucu başlamıştır. Araştırmalar sonunda eti yumuşatan ve kolayca sindirilmesini sağlayan faktörün yapraklarda ve meyvelerde bulunan papain enzimi olduğu anlaşılmıştır. Fakat sanılanın aksine meyvelerde yapraklardan daha çok papain enzimi bulunmuştur. Papain, vücudumuzda karbonhidrat ve yağlar gibi diğer bileşikleri de etkileyerek tüm sindirim sistemini olumlu yönde düzenleme yeteneğine de sahiptir. Papain'e, mide tarafından salgılanan ve proteinleri parçalayan enzim olan pepsin'e benzerliği nedeni ile bitkisel pepsin adı da verilir [38]. Papain, geleneksel bitki proteazı olup uzun yıllardır kullanılan bir enzimdir. Afrika ve Hindistan'ın alt tropikal alanlarında yetişen Carica papaya meyvesinin öz suyundan ekstrakte edilir. Papain peptidaz C1 familyasından bir sistein proteazdır. Farklı peptidaz izoenzimlerinin varlığı nedeni ile enzimin ham preparatı geniş bir spesifiteye sahiptir. Enzimin performansı, yetiştirildiği iklimsel koşullara, bitki kaynağına ve saflaştırılması ve ekstraksiyonu için kullanılan metotlara bağlıdır. Enzim pH 5-9 arasında aktiftir ve 80 ya da 90°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda substrat varlığında kararlıdır. Yüksek çözünürlüğe sahip olması nedeni ile endüstride, tatlandırılmış protein hidrolizatlarının hazırlanmasında çok kullanılır [2].

Bromelain, 1892'de Chittenden adlı bir araştırmacı tarafından ananas öz suyunda proteolitik enzim varlığını ilk kez tanımlandı ve "bromelein" olarak adlandırıldı. Daha sonra "bromelain" terimi kullanılmış ve orjinal olarak Bromeliaceae bitki ailesinin bir bitki üyesinin bir proteazı olarak tanımlanmıştır. Bromelain ilk kez terapötik destek olarak 1957'de tanıtıldı [39] ve o zamandan beri bilimsel literatürde yerini almış 600'den fazla araştırma makalesiyle birçok hastalığa önemli faydaları olduğu kanıtlanmıştır. Bromelain vücuttaki proteinleri ayrıştırıcı-sindirici bir enzimdir. Dolayısıyla onun ilk fark edilen özelliği, sindirimi veya hazmı kolaylaştıran bir madde olmasıdır. Bu yüzden gıda sanayisinde ve bazı kültürlerde et yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır. Bromelain ananas bitkisinin sap ve gövdelerinden elde edilmektedir. Bu enzim sadece mide asidine yardımcı olmakla kalmayıp, aynı zamanda bağırsaklardaki alkalen ortama da olumlu tesirler yapmaktadır. Bu nedenle sindirim sistemi enzimlerinden pepsin ve tripsin'in yerine

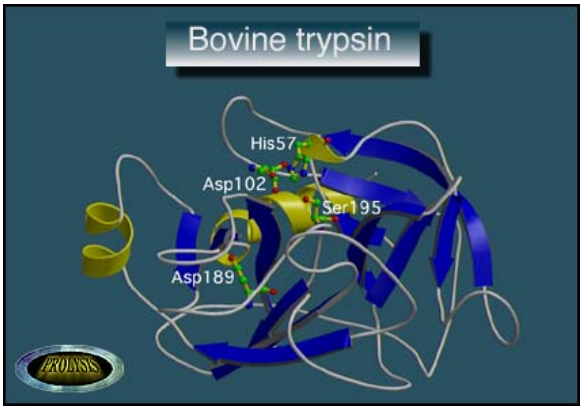
geçen enzim gibi düşünülür [40]. En büyük üreticisi Great Food Biochem., Bangkok, Tayland'dır. Enzim bir sistein proteaz olarak karakterize edilir ve pH 5-9 arasında aktiftir. İnaktivasyon sıcaklığı 70°C olup papainin inaktivasyon sıcaklığından daha düşüktür [1]. Bromelain'in çağdaş kullanımı sadece sindirim sistemini desteklemekle sınırlı değildir. Antiinflamatuar (iltihap giderici-iltihabi reaksiyonu önleyen madde) etkisi sayesinde romatoid artrit (Rhumatoid arthritis) ve sinüzit (sinusitis) tedavisinde yardımcı olduğu da klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Üstelik bromelain'in sinüzit tedavisine olumlu etkileri ile ilgili kanıtların bir kısmı double-blind (ne hasta ne de araştırmacının neyin tedavi edilmeye çalışıldığını bilmediği bir klinik araştırma türü) araştırmalarla desteklenmiştir. Bir başka double-blind çalışmada ise bromelain+tripsin kombinasyonu ile antibiyotik tedavisi alan idrar yolları enfeksiyonlu hastaların tamamı iyileşmişlerdir. Sadece antibiyotik tedavisi gören hastalarda bu oran % 46'da kalmıştır. Yapılan ön klinik araştırmalarda ise 3-13 hafta boyunca bromelain verilen romatoid artrit hastalarının %73'ünde iyi derecede iyileşmeler gözlenmiştir. Bromelain, aşırı trombosit yapışkanlığını önlediği için doğal bir kan incelticidir ve bromelain'in bu özelliği angina (Angina pektoris-kalbe yeterli kan ulaşmaması sonucu ortaya çıkan göğüs ağrısı) ve tromboflebit (kan pıhtılaşmasının sonucu olarak oluşan damar iltihabı) semptomlarının azalması şeklinde kendini göstermektedir. Ayrıca bromelain balgam veya sümük yoğunluğunu da azaltmaktadır. Bu durum astım ve kronik bronşit hastalarına faydalı olabilmektedir [40].

Keratinaz, kılları ya da saçı degrede eden bir enzim olup bazı bitkiler tarafından üretilir. Saç ve yünün parçalanması lizin gibi esansiyel amino asitlerin üretilmesi açısından önemlidir. Atık su sistemlerinde bulunan bu tür doğal atıkların da parçalanması açısından da bu enzim önemlidir [1].

Fisin, incir lateksinden (sütünden) izole edilir, papain ve bromelaine benzer aktif bölgesiyle bir sülfhidril proteazdır. Ficin, yüksüz ve aromatik amino asitler içeren bağlarda etkilidir. Fisin'in optimum pH'sı 6.5'tur ve pH 4-9.5 arasında etkilidir. Fisin antik çağda peynir mayası olarak sütün pıhtılaştırılmasında kullanılmıştır. Endüstride biracılık, et, yemler ve deniz ürünlerinde kullanılırlar [41].

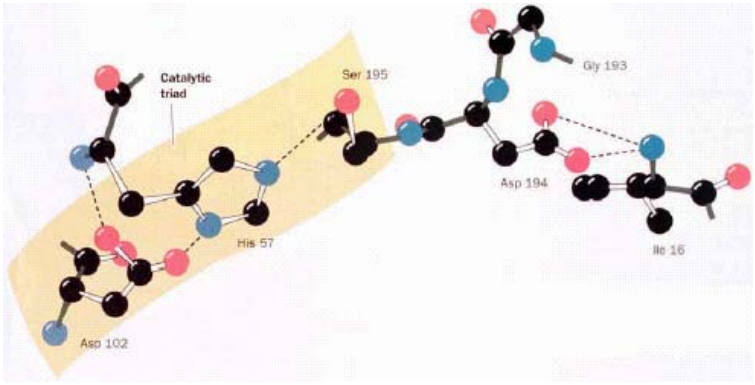
İkinci grup proteaz kaynağını hayvansal proteazlar oluşturur. En çok bilinen hayvansal kaynaklı proteazlar, pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir. Adı geçen proteazlardan tripsin, kimotripsin ve elastazın peptid bağında etki ettikleri noktalar şekil 2.2'de gösterilmiştir.

Tripsin, (EC 3.4.21.4 ve M_r 23300 Da) pankreastan salgılanan ince bağırsakta proteinleri parçalayıcı özelliğe sahip sindirim enzimidir. Enzimatik mekanizması diğer serin proteazlara benzer. Aktif bölgesinde katalitik triadda bir serin nükleofili vardır. Kataliz serinin çevresindeki diğer amino asitlerin elektrostatik modifikasyonu ile başarılır. Tripsinin optimum pH'sı yaklaşık 8 ve optimum sıcaklığı da yaklaşık 37ºC'dir. Tripsin inaktif zimogen (tripsinojen), şeklinde pankreasta üretilir, sonra ince bağırsağa salgılanır ve orada enteropeptidazlar proteolitik parçalanmayla tripsinin aktivasyonunu başlatır, daha sonra tripsin kendi kendini aktive eder. Bu aktivasyon mekanizması çoğu serin proteazlar için geneldir ve pankreasın kendi kendini sindirmesini önlemek için gereklidir. Tripsin bir serin endopeptidazdır ve peptid bağlarını lizin ve arjinin rezidülerinden sonraki karboksil gruplarından hidrolizler. Tripsin aktivitesi, kimotripsini deaktive eden TPCK (tosil fenilalanil klorometil keton) inhibitörü tarafından etkilenmez. Bu, kütle spektrometri gibi bazı uygulamalardan dolayı önemlidir. Tripsin bakteriyel ortamın hazırlanmasında ve bazı özel tıbbi uygulamalarda kullanılır [42]. Enzimin oluşturduğu protein hidrolizatlarının acı tada sahip olmaları nedeni ile gıda endüstrisinde tripsin kullanım alanları sınırlıdır. Tripsin'in üç boyutlu konformasyonel yapısı şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8: Tripsin'in üç boyutlu konformasyonel yapısı [43]

Kimotripsin, (EC 3.4.21.1 ve M_r 23800 Da) proteolizi gerçekleştirebilen hayvansal pankreatik ekstraktlarında bulunan sindirim enzimidir. Bir serin proteazdır ve peptid bağlarını fenilalanin, tirozin ve triptofan rezidülerinden sonraki karboksil gruplarından hidrolizler. Kimotripsinojen prekursörü şeklinde pankreasta depolanır ve çok adımlı bir proseste tripsin tarafından aktive edilir. Saf kimotripsin pahalı bir enzimdir ve yalnızca diagnostik ve analitik uygulamalarda kullanılır. Süt protein hidrolizatlarının deallerjenasyonunda çok kullanılır [1]. Kimotripsin'in aktif bölge rezidüleri şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9: Kimotripsin'in aktif bölge rezidüleri [44]

Pepsin, (EC 3.4.23.1 ve M_r 34500 Da) gıda proteinlerini peptidlere parçalamak için, hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde ana hücreler tarafından salgılanan asidik proteazdır. Pepsin 1836'da Theodor Schwann tarafından keşfedildi ve keşfedilen ilk hayvansal enzimdir. Aktif enzim onun zimojen formundan (pepsinojen, hidroklorik asit varlığında kendiliğinden katalizi ile) salınır. Pepsin bir aspartil proteazdır ve pH 1-2 arasında optimum aktivite gösterir, pH 6'nın üzerinde inaktive olur ve iki hidrofobik amino asit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini katalizler [45].

Renin, (rennet, kimozin, EC 3.4.23.4 ve M_r 30.700) anne sütünü sindirmek için her bir memelinin midesinde üretilen doğal kompleks bir enzimdir. Renin sütü pıhtılaştıran proteolitik bir enzim içerir. Hayvansal bazlı rennet için en yaygın kaynak yeni doğan sütle beslenmiş buzağının kesilen şirdenidir [46]. Pepsine benzer proteazdır ve bütün süt veren memelilerin midelerinde inaktif pro-renin prekursörü olarak bulunur. Pepsinin işleviyle ya da kendi kendine katalizle aktif renine dönüşür.

Süt endüstrisinde süt kazeininin çöktürülmesinde çok kullanılır. Çözünmez para-κ-kazein ve C-uçlu glikopeptid yaratmak için κ- kazeindeki tek bir peptid bağını ayırma spesifisitesi ile özelleşmiş doğal enzimdir ve stabil hoş kokulu lor üretimi için süt endüstrisinde kullanılır [1].

Üçüncü grup proteaz kaynağı, bakteri, fungus ve virüs orijinli olan mikrobiyal proteazlardır. Mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalar için hemen hemen tüm karakteristiklerinin istenen yönde değiştirilebilmesi mümkün olduğundan mikrobiyal kaynaklı proteazlar bitki ve hayvan kaynaklı proteazlara tercih edilmektedirler.

Bakteri orijinli mikrobiyal proteazlar, başlıca nötral ve alkalen ticari proteazların çoğu *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilirler. Bakteriyel nötral proteazlar, pH 5-8 arasında ve düşük sıcaklıklarda aktiftirler ve bağıl olarak düşük termotoleransa sahiptirler. Gıdaları hidrolizlediklerinde hidrolizatlarında daha az acı tat oluşturduklarından gıda endüstrisinde hayvansal proteazlara tercih edilirler. Nötraz olarak da bilinen nötral proteazlar doğal bitki proteaz inhibitörlerine karşı duyarsızdırlar ve bu sebeple de fırıncılık endüstrisinde kullanılırlar. Hidrofobik amino asit çiftlerine yüksek afiniteleriyle karakterize edilirler. Sahip oldukları düşük termotoleransları gıda hidrolizatlarının üretimi sırasında reaktivitelerinin kontrolü için avantajlıdır. Bazı nötral proteazlar metalloproteazlar grubuna üyedirler ve aktivite gösterebilmek için iki değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duyarlarken serin proteazlar şelat yapıcı ajanlar tarafından etkilenmezler.

Bakteriyel alkalen proteazlar, geniş substrat spesifisitesi ve alkalen pH'daki yüksek aktivitesiyle karakterize edilirler. Optimum sıcaklığı 60°C civarındadır ve pH 10'da optimuma sahiptirler. Bakteriyel alkalen proteazların bu özellikleri onları deterjan endüstrisinde kullanmak için uygun kılar [1].

Fungus orijinli mikrobiyal proteazları üreten mantarlar bakterilerden daha geniş kapsamlı enzim üreticileridirler. Örneğin, *Aspergillus oryzae* asit, nötral ve alkalen proteazları birlikte üretir. *Aspergillus oryzae*, *A. oryzae (flavus)*, *A. carbonarius* ve *Trichoderma* türleri buğday kepeğinde büyütüldüklerinde iyi derecede proteaz

aktivitesi ürettiği gözlenmiştir (katı hal fermentasyonu) [47]. Ayrıca fungal proteazlar pH 4-11 gibi geniş bir pH aralığında aktivite gösterirler. Bakteriyel kaynaklı enzimler ile karşılaştırıldıklarında bakteriyel enzimlerden daha düşük reaksiyon hızına ve daha kötü bir sıcaklık toleransına sahiptirler. Fungal enzimler katı hal fermentasyon prosesi ile üretilirler. Fungal asit proteazlar pH 4-4.5 arasında optimuma sahiptirler, pH 2.5-6 arasında kararlıdırlar. Özellikle peynir yapımı endüstrisinde dar pH ve sıcaklık spesifisitesinden dolayı kullanılırlar. Fungal nötral proteazlar ya da metaloproteazlar, pH 7'de aktiftirler ve şelatlayıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar. Besin protein hidrolizatlarının acılığının azaltılmasında kullanılırlar. Fungal alkalen proteazlar ise gıda proteinlerinin modifikasyonunda kullanılırlar [1].

Virus orijinli mikrobiyal proteazlar, viral proteazlar özellikle virüs proteinlerine olan hassasiyetleri dolayısıyla önemlidirler. Viral proteazlar, viral replikasyon ve birleşimi koordine etmek ve düzenlemek için optimize edilmişlerdir. Yapılan araştırmalarda viral proteazların üç boyutlu yapısı ve sentetik inhibitörler ile etkileşimi odak noktası olmuştur. Serin, aspartik, sistein peptidazlar değişik virüslerde bulunurlar. Virüs çıkışlı peptidazların hepsi endopeptidazlardır [48].

2.2.5. Alkalen proteazların özellikleri

Farklı mikroorganizmalardan elde edilen alkalen proteazların fizikokimyasal ve enzimatik özellikleri detaylı bir şekilde çalışılmıştır.

Alkalen proteazların optimum pH aralığı genellikle pH 9-11 arasında olmakla birlikte, optimum pH değerleri pH 11.5, pH 11-12, pH 12.3 ve pH 12-13 olan birkaç istisna durum da vardır. Alkalen proteazlar yüksek izoelektrik noktalarına da sahiptirler ve genellikle pH 6-12 arasında kararlıdırlar. Optimum sıcaklık değerleri de genellikle 50-70°C'dir. Alkolofilik *Bacillus* sp. B 18'den izole edilen enzim istisna olarak 85°C gibi yüksek optimum sıcaklığa sahiptir. *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. ve *Thermus* sp.'den izole edilen alkalen proteazlar da yüksek sıcaklıkta bir miktar termostabilite göstermekle birlikte, ortama Ca^{2+} iyonlarının ilavesi ile enzim termostabilitesinde artış gözlenir [2].

Alkalen proteazların moleküler ağırlıkları genellikle 15-30 kDa arasında ise de, birkaç yayında 31.6 kDa, 33 kDa, 36 kDa ve 45 kDa gibi daha yüksek moleküler ağırlığa sahip olan enzimlerin de var olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, *Kurthia spiroforme*'den izole edilen enzimin 8 kDa gibi çok düşük molekül ağırlığına sahip olduğu da bilinmektedir. Bazı *Bacillus* türlerinden izole edilen alkalen proteazların çoklu elektroforetik formlara sahip olduğu gözlenmiştir. Bu enzimlerin çoklu formları protein molekülündeki glutamin ya da asparagin rezidülerinin irreversible deaminasyonu gibi nonenzimatik bir yolla ya da protein molekülünün otoproteolizi ile oluşur [2].

Alkalen proteazlar maksimum aktivite gösterebilmek için Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} gibi iki değerlikli katyonlara veya bu katyonların bir kombinasyonuna ihtiyaç duyarlar. Bu katyonların *Bacillus* alkalen proteazlarının termal stabilitesini arttırdığı da bulunmuştur. Bu katyonlar enzimi termal denatürasyona karşı korurlar ve yüksek sıcaklıklarda enzimin aktif konformasyonunu korumada önemli bir rol oynarlar.

Çeşitli inhibitörlerle yapılan inhibisyon çalışmaları enzimin doğası, aktif merkezinin yapılanması ve enzimin kofaktör ihtiyacı konusunda bilgi verir. Alkalen proteazlar genellikle PMSF (Fenilmetilsülfonil florür) ve DFP (Diizopropil florofosfat) ile tamamen inhibe olurlar. PMSF aktif bölgedeki serin rezidülerini sülfolar ve aktivite tamamen kaybolur. Bu inhibisyon profili bu proteazları serin hidrolazlar olarak tanımlar. Buna ek olarak, bazı metalo alkalen proteazların EDTA (Etilendiamin tetraasetikasit) ile inhibe olduğu bulunmuştur.

Alkalen proteazlar doğal proteinleri hidrolizledikleri başarı ile bazı sentetik substratları da hidrolizlerler. Alkalen proteazların ve subtilizinlerin kazeine karşı hemoglobin ya da sığır serum albumine olduğundan daha aktif oldukları bulunmuştur. Alkalen proteazlar tirozin, fenilalanin gibi aromatik ya da hidrofobik amino asit rezidülerinin yer aldığı peptid bağlarının hidrolizine karşı spesifiktirler [2].

2.2.6. Proteazların endüstriyel uygulamaları

İdeal deterjan proteazlar, yiyecek, kan ve diğer vücut salgılarından dolayı lekelerin büyük bir kısmının uzaklaşmasını kolaylaştırmak için, geniş substrat spesifisitesine sahip olmalıdır. Bir deterjan içinde bir proteazın en iyi performansı için anahtar parametre onun pI'sıdır. Deterjan çözeltisinin pH'ı ile pI'sı birbirine uyumlu ise proteazın bu uygulama için çok uygun olduğu kabul edilir. Alkalofilik *Bacillus spp.* tarafından üretilen Esperase ve Savinase T (Novo Endüstrisi) çok yüksek izoelektrik noktaya sahip (pI 11) iki ticari proteazdır, bu yüzden onlar daha yüksek pH değerlerine dayanabilirler. Son zamanlarda endüstride kullanılan bütün deterjan proteazlar, *Bacillus* türleri tarafından üretilen serin proteazlardır. *Conidiobolus coronatus*'tan elde edilen bir alkalen proteazın Hindistan'da üretilen ticari deterjanlarda kullanıldığı belirtilmiştir [1].

Deterjanlara alkalen proteaz ilavesinin amacı protein kökenli lekeleri %35-40 uzaklaştırarak temizleme etkisini arttırmaktır [49]. Bakterilerden özellikle yüksek sıcaklık ve pH'larda büyüyen bir *Bacillus* soyu tarafından üretilen proteaz enzimleri, deterjanlara katkı maddesi olarak eklenmekte sıcak su ile daha etkin temizlik sağlayacak yıkama olanağını vermektedir. Biyoteknolojide uygulama olanağı bulacağı düşüncesi termofilik enzimlere olan ilgiyi arttırmıştır. Dolayısıyla tekstil ve deterjan endüstrisinde özellikle termofilik ve alkalifilik mikroorganizmaların ürettiği amilaz ve proteaz üreticisi *Bacillus* soylarının taranmasına, izolasyon ve nitelendirmesine yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Deri prosesi sepileme, tabaklama, ıslatma ve kıl giderme gibi bazı adımlar içerir. Deri prosesinin konvansiyonel metodları, kirlilik problemleri ve atık su problemleri yaratan sodyum sülfür gibi zararlı kimyasallar içerir. Bu kimyasallara alternatif olarak enzimlerin kullanımı, çevresel kirliliği azaltmada ve deri kalitesindeki düzelmede başarılı olmuştur. Proteazlar derinin kollajen olmayan yapılarının seçimli hidrolizinde ve globulinler ve albuminler gibi fibril yapıda olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır.

Gıda endüstrisinde proteazların kullanımı eski zamanlara dayanır. Onlar rutin olarak peynir yapımı, fırıncılık, soya hidrolizatlarının hazırlanması ve et yumuşatma gibi çeşitli amaçlar için kullanılır. Buğday unu fırıncılık prosesinin en büyük bileşenidir. Fırın hamurlarının özelliklerini belirleyen gluten olarak adlandırılan suda çözünmeyen bir protein içerir. *Aspergillus oryzae*'den elde edilen endo ve exoproteinazlar sınırlı proteoliz ile buğday gluteni modifiye etmek için kullanılmıştır. Fungal proteazlar beyaz ekmek ve poğaçaların yapımında da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Fungal proteazların aşırı miktarları, ekmeği hamurumsu bir hale getirir. Enzim ilavesi özellikle sert hamurlar ve elastiki hamurlar için uygundur. Hamurun enzimatik muamelesi onun elle ve makine ile üretimini kolaylaştırır ve ürünlerin daha geniş bir aralıkta üretimine izin verir. Proteazların ilavesi artan somun hacimlerinde karışma zamanını yaklaşık % 25 oranında azaltmaktadır. Özellikle *Bacillus subtilis* bakteriyel proteazları kek, bisküvi ve kraker yapımında kullanılır. Bu proteazlar hamurların yumuşamasını geciktirmek için kullanılır ve özellikle kraker üretiminde çok önemlidir. Bakteriyel proteazlar hamurun kuvveti ve uzama kabiliyetini arttırmak için kullanılır.

Süt en az iki proteinaz içerir, plazmin (alkalen süt proteinaz) ve katepsin D (asit süt proteinaz) ve olası diğer proteinazlar da iki tiyol proteinaz, trombin ve bir aminopeptidazdır. Aktivite koşulları ve teknolojik önemi dikkate alındığında plazmin en önemli doğal proteinazdır ve en ilgi çeken konu olmuştur [50, 51]. Süt endüstrisinde proteazların en büyük uygulaması peynir üretimindedir. Süt-pıhtılaştırıcı enzimler, hayvansal peynir mayaları, mikrobiyal süt pıhtılaştırıcıları ve genetik olarak yapılmış kimozin olmak üzere üç ana kategoriye ayrılır. Hayvansal ve mikrobiyal süt-pıhtılaştırıcı proteazların her ikisi de asit aspartat proteazların bir sınıfına aittir ve moleküler ağırlıkları 30000-40000 Da arasındadır. Peynir mayası sığırların şirdeninden ekstrakte edilir ve pepsin aktivitesi için en yüksek kimozin oranını içerir. Sütü pıhtılaştırmasının yanı sıra, proteazlar kazeinin hidrolizinde, peynir olgunlaştırmasının hızlandırılmasında, peynirin göreceli özelliklerinin düzeltilmesinde ve tadın attırılmasında kullanılırlar. Buzağı renneti % 75-95 rennin (kimozin), % 5-25 pepsin içermektedir. Sığır renneti % 70-99 pepsin, % 1-9 rennin içermektedir. Buzağı rennini sınırlı proteolitik aktivitesiyle yüksek kazein koagüle edici yeteneğe sahiptir. Pepsin gibi diğer süt pıhtılaştırıcı proteazların birçoğundan

farklı olarak, rennin peynirin olgunlaştırma işlemine karışmaz. Aşırı olgunlaştırma, daha az lor verimine ve bazı acı peptidlerin birikmesine sebep olur. Rennin diğer tüm koagülantlara nazaran standart bir süt pıhtılaştırıcı enzimdir. Süt pıhtılaştırıcı enzimler fenilalanin-metionin bağını hidrolizlerler. Koagülasyon genellikle kapa kazein misellerinin % 95'i veya daha fazlası hidroliz edildiğinde başlar. Mikrobiyal rennet proteazları buzağı rennetinden daha proteolitiktirler.

Protein hidrolizatları, küçük çocuklarda normal ve klinik gıda malzemelerine katkı maddesi ve tatlandırıcı ajanlar olarak, sağlık ve diyet ürünlerinin oluşumu gibi bazı uygulamalara sahiptir. Protein hidrolizatlarının acı tadı onların gıda ve sağlık bakım ürünlerinde kullanımlarına büyük bir engel oluşturmaktadır. Acılığın yoğunluğu hidrolizat içindeki hidrofobik amino asitlerin sayısıyla orantılıdır. Peptid merkezindeki prolin rezidülerinin varlığı da acılığa katkıda bulunur. Prolin ve hidrofobik amino asitleri ayırabilen peptidazlar, protein hidrolizatlarının acılığının giderilmesinde kullanılır. Laktik asit bakterilerinden elde edilen aminopeptidazlar Debitrase ticari adı altında mevcuttur. Karboksipeptidaz A hidrofobik amino asitlere yüksek spesifisiteye sahip olduğundan acılık giderme (debittering) için büyük bir potansiyele sahiptir.

Yüksek içerikte iyi kaliteli protein içerdiklerinden dolayı soya fasulyeleri zengin bir besin kaynağı olarak işe yarar. Proteazlar diğer soya ürünleri ve soya sosu hazırlamak için eski zamanlardan beri kullanılmıştır. Fungal alkalen ve nötral proteazlar soya sosu prosesinde önemli bir rol oynar. Soya proteinlerinin proteolitik modifikasyonu onların fonksiyonel özelliklerini düzeltmeye yarar. pH 8'de alkalaz ile soya proteinleri muamelesi yüksek çözünürlük, iyi protein ürünü ve düşük acılık ile çözünür hidrolizatlar ile sonuçlanır.

Yapay tatlandırıcılar olarak aspartam kullanımı gıda ve ilaç yöneticileri tarafından uygun görülmüştür. Aspartam L-aspartik asit ve L-fenil alanin metil esterinin birleşimi olan bir dipeptiddir. İki amino asidin L-konfigürasyonu aspartamin tatlı tadından sorumludur. *Bacillus thermoprotyolticus* tarafından üretilen termolizinin immobilize hazırlanışı aspartamın enzimatik sentezinde kullanılır.

Proteazların geniş spesifisitesi ve çeşitliliği tedavi edici ajanların gelişiminde büyük bir avantaj olarak kullanılır. Subtilizin yada kollegenaz yanık ve yara tedavisinde antibiyotiklerin geniş bir aralıkta kullanımıyla kombinasyonda kullanılır. *E .coli*'den izole edilen Asparaginaz lemfositik lösemilerin çeşitli formlarında kan akışından asparagini elimine etmek için kullanılır [1].

2.2.7. Tez çalışmasında kullanılan *Bacillus clausii* GMBAE 42 enziminin özellikleri

2.2.7.1. Genel özellikler

Bacillus clausii GMBAE 42 enziminin, kimotripsine benzer bir serin alkalen proteaz olduğu belirlenmiştir. Molekül ağırlığı 26.5 kDa, optimum pH'sı 11.3, optimum sıcaklığı 60ºC'dir. Enzim PMSF ile şiddetle inhibe olduğundan bir serin alkalen proteazdır [52].

2.2.8. Tez çalışmasında kullanılan kinetik ve termodinamik bağıntılar

2.2.8.1. K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi için Michaelis-Menten denklemi

Bacillus clausii GMBAE 42 alkalen proteaz enzimiyle kazein hidrolizinde enzimin K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesinde yatışkın hal (steady-state) yaklaşımına göre türetilmiş ve başlangıç hızı koşullarında geçerli aşağıda yazılı Michaelis-Menten denklemi (2.1) ve onun resiprokal formu (2.2) kullanılmıştır [53].

$$v = \frac{V_m.[S]}{K_m + [S]} \tag{2.1}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} \tag{2.2}$$

Bu denklemde :

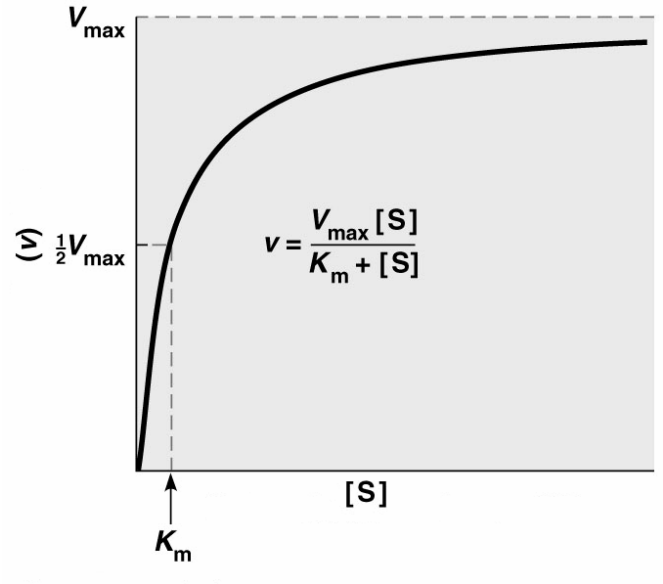
v: 30ºC'de ve pH 10.5'da ölçülen kazein hidroliz reaksiyonunun başlangıç hızını (U ml^{-1} dak^{-1})

[S]: 50 mM pH 10.5 NaOH-Glisin-NaCl tamponu çözeltisi içinde çözünmüş kazeinin başlangıç konsantrasyonunu (mg ml^{-1})

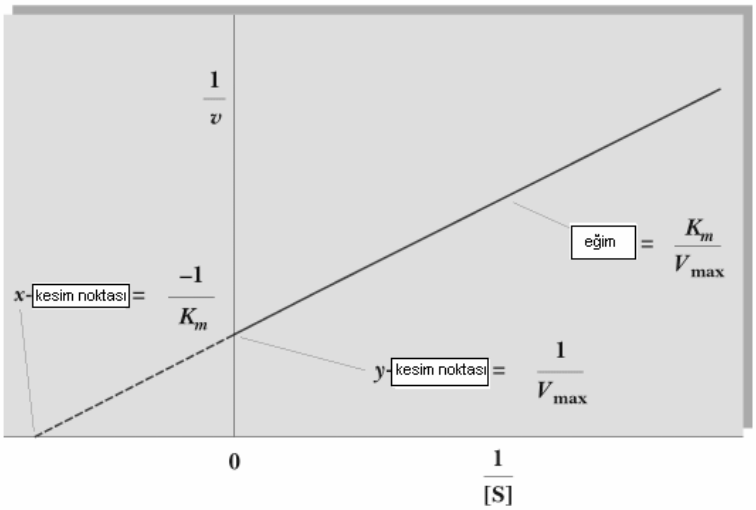
K_m: Kazein hidrolizi için belirlenen koşullarda enzimin Michaelis-Menten sabitini (mg ml^{-1} kazein)

V_m: Kazein hidroliz reaksiyonu için ulaşılabilecek maksimal başlangıç hızını (U ml^{-1} dak^{-1}) göstermektedir.

(2.1) nolu denklem v'ye karşı [S] gelecek şekilde işaretlendiğinde şekil 2.10'da görülen bir hiperbol elde edilir.



Şekil 2.10: v'ye karşı [S] diyagramı



Şekil 2.11: Lineweaver-Burk diyagramının görünüşü

(2.2) nolu denklem 1/v' ye karşı 1/[S] gelecek şekilde işaretlendiğinde ise şekil 2.11'de görülen bir lineer doğru elde edilir. Lineweaver-Burk diyagramı olarak adlandırılan bu grafikdeki doğrunun eğiminden ve 1/v ile 1/[S] ekseni üzerindeki kesim noktalarından V_m ve K_m değerleri hesaplanır.

Enzimin V_m değeri ile reaksiyon ortamındaki total enzim konsantrasyonu arasında aşağıdaki bağıntı vardır:

$$V_m = k_{cat} \, . \, [E_t] \qquad (2.3)$$

$[E]_t$: Total enzim konsantrasyonunu,
k_{cat}: Enzim için katalitik hız sabitini ya da turn-over sayısını göstermektedir, (dak^{-1}).

2.2.8.2. Hidroliz reaksiyonunun aktivasyon enerjisi

Bir reaksiyonunun hız sabiti (k) ile aktivasyon enerjisi (E_a) arasındaki bağıntı Arrhenius denklemi ile verilir.

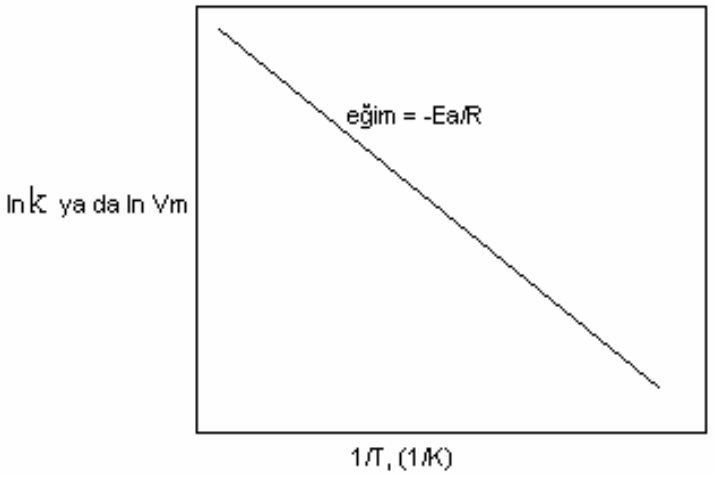
$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \qquad (2.4)$$

ya da

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \qquad (2.5)$$

A: Belirli bir reaksiyona ilişkin bir sabittir. lnk'ya karşı 1/T çizimi lineer olup şekil 2.12'de gösterilmiştir.

Enzimatik kataliz reaksiyonunda katalitik hız sabiti $k_{cat} = (V_m/[E]_t)$ ya da birinci mertebe hız sabitidir. Dolayısıyla log k_{cat} ya da $\log(V_m/[E]_t)$'ye karşı 1/T çizimi de katalitik adım için E_a aktivasyon enerjisini verir. Pratikte ise $\log(V_m/[E]_t)$ yerine log V_m çizilebilir, çünkü bir enzim preparasyonunun V_m değeri k_{cat} ile doğru orantılıdır. Birçok enzimatik reaksiyon için V_m'in değeri birkaç hız sabitine bağlı olabilir ve bunların her biri sıcaklığın değişmesiyle farklı şekilde etkilenir. Bu durumda Arrhenius çiziminden hesaplanan E_a görünen bir ortalama değer olur.



Şekil 2.12: Farklı sıcaklıklarda ölçülen hız sabitinin lnk'ya karşı 1/T işaretlenmesiyle elde edilen E_a aktivasyon enerjisi. Enzimatik reaksiyonlar için $\ln(V_m/[E]_t)$ ya da $\ln V_m$'e karşı 1/T diyagramı da çizilebilir

2.2.9. Enzimin termal inaktivasyonunun söz konusu olduğunda kinetik bağıntılar

Enzimlerin tersinir olmayan inaktivasyonunun mekanizması aşağıda gösterildiği gibi iki adımlı süreç olarak düşünülebilir.

$$E_n \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} E_t \xrightarrow{k_i} E_i \tag{2.6}$$

E_n, E_t ve E_i sırasıyla enzimin başlangıç, geçiş hali (transient) ve inaktive olmuş şekillerini gösterir. k_i enzimin birinci mertebe inaktivasyon hız sabitidir (dak^{-1}). k_{+1} ve k_{-1} ise inaktivasyona hassas hale gelmiş geçiş hali ile enzimin doğal hali arasındaki denge reaksiyonunun ileri ve geriye doğru olan hız sabitleridir.

Birinci adım sonunda tersinmez inaktivasyona daha duyarlı olan enzimin geçiş hali oluşur. İnaktive edici koşullar sürdüğü takdirde ikinci adım sonunda enzimin geçiş hali birinci dereceden inaktivasyon kinetiği izleyerek tersinmez inaktivasyona uğrar. Görünen inaktivasyon hızı (v_i) aşağıdaki gibi hesaplanabilir:

$$v_i = \frac{dE_T}{dt} = -k_i . E_T \tag{2.7}$$

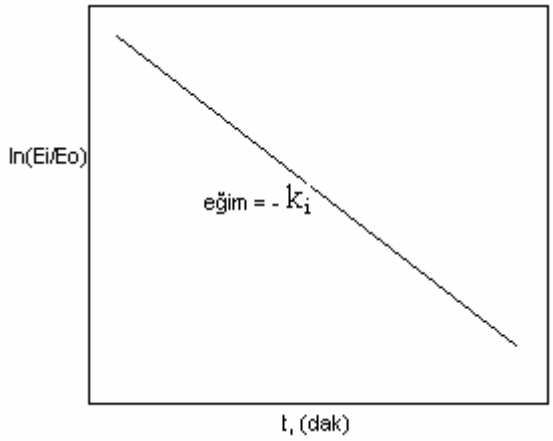
$$\int_{E_T}^{E_i} \frac{dE_T}{E_T} = -k_i \int_0^t dt \tag{2.8}$$

$$\mathrm{Ln}\left(\frac{E_i}{E_T}\right) = -k_i.t \qquad (2.9)$$

Bu denklemde k_i, enzimin tersinmez inaktivasyonunun hız sabiti, t, zaman, E_i ve E_T enzimin sırası ile inaktive ve geçiş hallerinin konsantrasyonlarıdır. Ancak inaktivasyon hız sabitini belirlemede bu konsantrasyon terimleri yerine enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğundan dolayı enzimatik reaksiyonların başlangıç hızları kullanılır. İnaktivasyon başlamadan hemen önce enzimin başlangıç konsantrasyonu E_0 ile gösterilirse $E_0 = E_T$ olacağından (2.9) denklemi,

$$\mathrm{Ln}\left(\frac{E_i}{E_0}\right) = -k_i.t \qquad (2.10)$$

şeklinde yazılabilir. Bu takdirde E_0 ve E_i, sırası ile tersinmez inaktivasyon başlamadan önce ve inaktivasyondan sonraki başlangıç hızları olarak tanımlanır. (2.10) denklemi Ln (E_i/E_0)'a karşı t (zaman) işaretlendiğinde bir lineer doğru verir (Şekil 2.13). İnaktivasyon hız sabiti, (k_i) doğrunun eğiminden belirlenir.



Şekil 2.13: İnaktivasyon hız sabiti grafiği

(2.10) denkleminde $E_0 = 2E_i$ olduğu zaman $t = t_{1/2}$ olur. Buna enzimin yarı ömür süresi denir. k_i ve $t_{1/2}$ değerleri arasında,

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} = \frac{0,693}{k_i} \qquad (2.11)$$

bağıntısı vardır [54].

2.2.10. Enzimin inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$)

Alkalen proteaz yüksek sıcaklıklarda termal inaktivasyonunun (2.6) denklemi ile ifade edildiği göz önüne alınarak buradaki inaktivasyon reaksiyonunun aktivasyon enerjisinin hesaplanmasında da Arrhenius bağıntısı geçerlidir. Bu durumda grafik çizilirken değişik sıcaklıklardaki enzimin inaktivasyonunun hız sabitleri (k_i değerleri) dikkate alınmalıdır. Enzim inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) ln k_i'ye karşı 1/T işaretlenmesiyle elde edilen Arrhenius grafiğinden hesaplanır. Grafikte elde edilen lineer doğrunun eğimi :

$$\text{Eğim} = -\frac{E_{a,i}}{R} \tag{2.12}$$

dir. Buradaki R gaz sabiti 8.314 J/mol.K alındığında $E_{a,i}$, J/mol'dür.

2.2.11. Enzimin termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik bağıntılar

Her bir sıcaklık değeri için inaktivasyonun entalpisi (ΔH_i),

$$\Delta H_i = E_{a,i} - RT \tag{2.13}$$

Her bir sıcaklık için inaktivasyonun aktivasyon serbest enerjisi (ΔG_i),

$$\Delta G_i = -RT \ln\left(\frac{k_i h}{k_B T}\right) \tag{2.14}$$

Her bir sıcaklık için inaktivasyonun entropisi (ΔS_i),

$$\Delta S_i = (\Delta H_i - \Delta G_i)/T \tag{2.15}$$

bağıntılar ile hesaplanır. ΔG_i ve ΔH_i'nin birimi kJ/mol, ΔS_i'in ise kJ/molK'dir. k_i, inaktivasyon hız sabiti, (dak^{-1}), h, Plank sabiti olup değeri 6.63×10^{-34} Js, k_B, Boltzman sabiti olup değeri 1.38×10^{-23} J/K'dir.

2.2.12. Substrat hidrolizine ilişkin termodinamik bağıntılar

Substrat hidrolizinin aktivasyon enerjisi,

$$\Delta G^{\neq} = -RT \ln\left(\frac{k_{cat} h}{k_B T}\right) \tag{2.16}$$

Substrat hidrolizinin aktivasyon entalpisi,

$$\Delta H^{\neq} = \Delta E_a - RT \tag{2.17}$$

Substrat hidrolizinin aktivasyon entropisi,

$$\Delta S^{\neq} = (\Delta H^{\neq} - \Delta G^{\neq}) / T \tag{2.18}$$

Tranzisyon hali bağlama serbest enerjisi,

$$\Delta G^{\neq}_{E-T} = RT \ln \frac{k_{cat}}{K_m} \tag{2.19}$$

Substrat bağlanmanın serbest enerjisi,

$$\Delta G_{E-S} = -RT \ln K_m^{-1} \tag{2.20}$$

$\Delta G^{\neq}$, $\Delta H^{\neq}$, $\Delta G_{E\text{-}T}{}^{\neq}$ ve $\Delta G_{E\text{-}S}$' in birimleri kJ/mol, $\Delta S^{\neq}$'in ise kJ/molK'dir [55].

2.2.13. Enzim aktivasyonu söz konusu olduğunda kullanılan kinetik bağıntılar

Aktivatörler enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızını arttıran maddelerdir. Enzim aktivasyonunda iki temel hal söz konusudur. Bunlardan ilkinde aktivatör reaksiyonun hızını arttırır, fakat reaksiyon aktivatör yokluğunda da oluşur. Bu tip aktivasyona zorunlu olmayan (non-essential) aktivasyon denir. İkinci tipte ise enzimin gerçek substratı substrat-aktivatör (SA) kompleksi'dir. Zorunlu olmayan aktivasyonda mekanizma (reaksiyon şeması) ve denge denklemleri:

$$
\begin{array}{ccccc}
E + S & \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} & ES & \xrightarrow{k_p} & E + P \\
+ & & + & & \\
A & & A & & \\
{\scriptstyle k_{-A}}\uparrow\downarrow{\scriptstyle k_{+A}} & & {\scriptstyle k'_{-A}}\uparrow\downarrow{\scriptstyle k'_{+A}} & & \\
EA + S & \underset{k''_{-A}}{\overset{k''_{+A}}{\rightleftharpoons}} & ESA & \xrightarrow{k'_p} & EA + P
\end{array}
$$

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES$$

$$ES + A \underset{k'_{-A}}{\overset{k'_{+A}}{\rightleftharpoons}} ESA$$

$$EA + S \underset{k''_{-A}}{\overset{k''_{+A}}{\rightleftharpoons}} ESA$$

$$E + A \underset{k_{-A}}{\overset{k_{+A}}{\rightleftharpoons}} EA$$

$$ES \xrightarrow{k_p} E + P$$

$$ESA \xrightarrow{k'_p} EA + P$$

$$[ES]=\frac{[E][S]}{K_m} \qquad K_m=\frac{[E][S]}{[ES]} \qquad K_m=\frac{k_{-1}+k_{+1}}{k_{+1}} \qquad K'_A=\alpha K_A$$

$$[ESA]=\frac{[ES][A]}{K'_A} \qquad K'_A=\frac{[ES][A]}{[ESA]} \qquad K'_A=\frac{k'_{-A}}{k'_{+A}} \qquad K''_A=\alpha K_m$$

$$[ESA]=\frac{[EA][S]}{K''_A} \qquad K''_A=\frac{[EA][S]}{[ESA]} \qquad K''_A=\frac{k''_{-A}}{k''_{+A}} \qquad k'_p=\beta k_P$$

$$[EA]=\frac{[E][A]}{K_A} \qquad K_A=\frac{[E][A]}{[EA]} \qquad K_A=\frac{k_{-A}}{k_{+A}}$$

$v_A=k_P[ES]+k'_p[ESA]$ ve $V_m=k_P[E]_t$ olduğu dikkate alınarak aktivasyon olması halinde reaksiyonun hız denklemi aşağıda gösterildiği şekillerde olur ($k_p=k_{cat}$ dir):

$$v_A=\frac{V_m[S]}{K_m\dfrac{\left(1+\dfrac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1+\dfrac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)}+[S]\dfrac{\left(1+\dfrac{[A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1+\dfrac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)}} \tag{2.21}$$

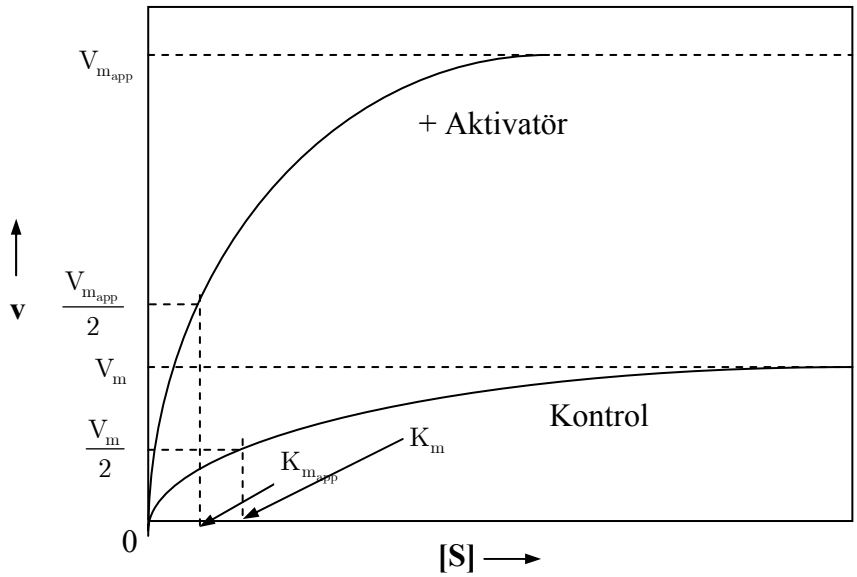
$$v_A = \frac{V_m \dfrac{\left(1+\dfrac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1+\dfrac{[A]}{\alpha K_A}\right)}[S]}{K_m \dfrac{\left(1+\dfrac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1+\dfrac{[A]}{\alpha K_A}\right)} + [S]} \tag{2.22}$$

Dolayısıyla herhangi bir aktivatör konsantrasyonunda:

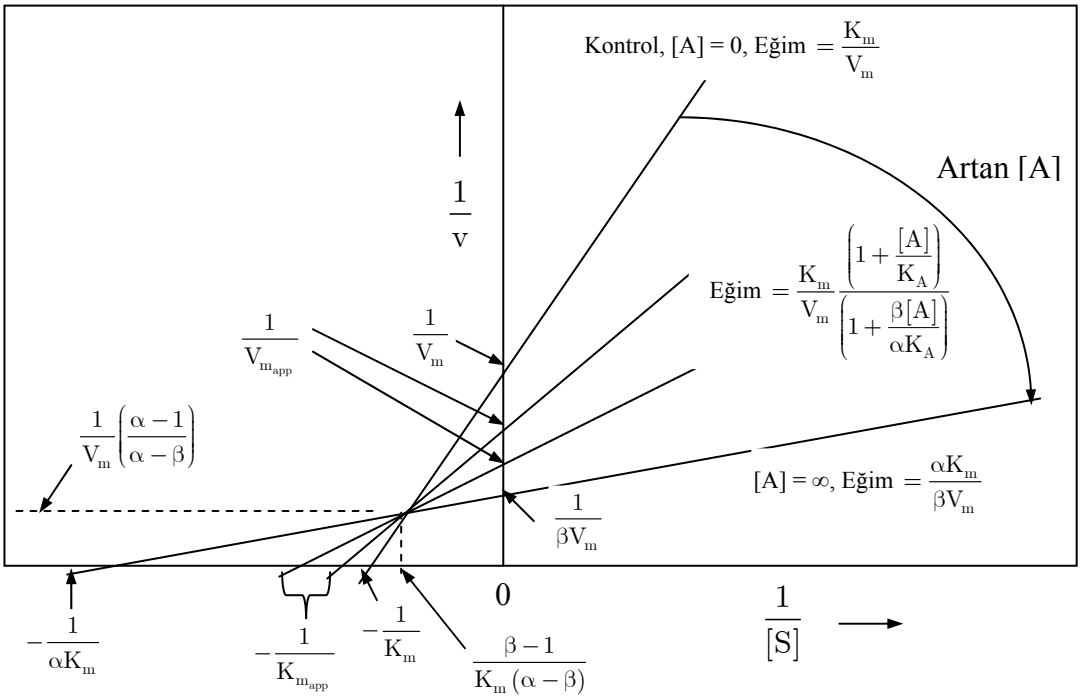
$$V_{m_{app}} = V_m \frac{\left(1+\dfrac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1+\dfrac{[A]}{\alpha K_A}\right)} \tag{2.23}$$

$$K_{m_{app}} = K_m \frac{\left(1+\dfrac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1+\dfrac{[A]}{\alpha K_A}\right)} \tag{2.24}$$

olur. Sonsuz yüksek aktivatör konsantrasyonunda çalışılırsa: $K_{m_{app}} = \alpha K_m$ ve $V_{m_{app}} = \beta V_m$ haline indirgenir. Gerçek olmayan aktivatör varlığında v ye karşı $[S]$ diyagramı şekil 2.14 de gösterilmiştir.



Şekil 2.14: Gerçek olmayan aktivatör varlığında v ye karşı [S] diyagramı



Şekil 2.15: Gerçek olmayan aktivasyon için Lineweaver-Burk Diyagramı

Diğer taraftan (2.22) denkleminin resiprokali alınıp düzenlenirse:

$$\frac{1}{v}=\frac{K_m}{V_m}\frac{\left(1+\frac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1+\frac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)}\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_m}\frac{\left(1+\frac{[A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1+\frac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)} \tag{2.25}$$

denklemi elde edilir. Bu denklemden türetilecek Lineweaver-Burk diyagramı şekil 2.15'de gösterilmiştir [56].

2.3. Alkalen Proteazın Otolitik Hidrolizi

Alkalen proteaz enziminin otolitik hidrolizi, kendi molekülü üzerinde katalitik etki göstermesi sonucu hidrolitik yıkıma uğramasıdır. Enzimin otolitik hidrolizi enzim çözeltisinde protein konsantrasyonunun azalması ile izlenir.

2.4. Tez Çalışmasında Kullanılan İstatistiksel Hesaplamalar

Aritmetik ortalama, dağılımdaki değerler toplamının veri sayısına bölünmesiyle bulunan değerdir. Aritmetik ortalama aşağıdaki formülde gösterildiği gibi hesaplanır.

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 \ldots + X_n}{n} \tag{2.26}$$

$$\bar{X} = \frac{\Sigma X_i}{n} \tag{2.27}$$

Standart sapma, dağılımdaki tüm verilerin aritmetik ortalamaya göre sapmalarının standart ölçüsüdür.

$$S = \sqrt{\frac{\Sigma X_i^2 - \frac{(\Sigma X_i)^2}{n}}{n-1}} \tag{2.28}$$

Standart hata (ortalamanın standart sapması, SEM), örneklem aritmetik ortalamasının hatasını ifade eder.

$$SEM = \frac{S}{\sqrt{n}} \tag{2.29}$$

Deneysel çalışmalarda örnekle ortalaması standart hatası ile birlikte ifade edilmelidir. Tez çalışmasında bulunan değerler ortalama ± ortalamanın standart sapması şeklinde verilmiştir [57].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Araçları

3.1.1. Araştırma olanakları (Cihaz vb.)

Araştırma, TÜBİTAK-MAM-GMBE, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı ile kolaboratif olarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Merck (Almanya), Fluka (İsviçre), Sigma (ABD) ve BioMerieux (Fransa), Oxoid Ltd (İngiltere), Difco (Amerika), Riedel (Almanya), JT Baker (Hollanda)'dan sağlanmıştır.

3.1.3. Mikroorganizma

Bu çalışmada, TÜBİTAK-GMBE, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı tarafından, farklı yerel ekosistemlerden taranarak izole edilen ve tanılanan *Bacillus clausii* GMBAE 42 soyundan elde edilen alkalen proteaz enzimi kullanılmıştır.

3.1.4. Alkalen proteaz enziminin üretimi

Bacillus clausii GMBAE 42 ile alkalen proteaz enzimi üretimi daha önce rapor edilen yöntemle üretilmiştir [52].

3.2. Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması

Bacillus clausii GMBAE 42 alkalen proteazı daha önce rapor edilen yöntemle üretilmiştir [52].

3.2.1. Alkalen proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Proteaz aktivitesi Anson yöntemine göre ölçülmüştür [58]. 0.5 ml enzim 50 mM glisin-NaCl-NaOH tamponunda hazırlanan %0.6'lık kazein çözeltisinin 2.5 ml'si ile karıştırılarak 30°C'da 20 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon, ortama 2.5 ml trikloroasetik asit çözeltisi (0.11 M TCA, 0.22 M Na-asetat, 0.33 M asetik asit) ilave edilerek durdurulmuş ve 30 dakika 30°C'de su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karışım süzülerek alınmış, filtratın 0.5 ml'si üzerine 2.5 ml 0.5 M sodyum karbonat çözetisi ilave edilmiş ve karışıma 2 kat seyreltilmiş 0.5 ml Folin-Ciocalteau reaktifi ilave edilerek, karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin 660 nm'deki absorbans değerleri (BioRad Smart Spec 3000) ölçülmüştür. Enzim aktivitesi standart tirozin grafiği oluşturularak (Ek A) aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi } (\text{U/ml/dak}) = \frac{(\text{OD}_{660}/\text{Eğim}) \times \text{Seyreltme Faktörü} \times \text{Toplam Hacim(ml)}}{\text{Enzim Hacmi(ml)} \times \text{İnkübasyon Süresi(dak)}}$$

Bir birim alkalen proteaz aktivitesi, kazeinin hidrolizi sonunda, 30°C'de, pH 10.5'da dakikada 1μg tirozin oluşturan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.1. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması

Alkalen proteaz aktivitesi hesaplamasında kullanılacak olan tirozin standart grafiğinin çıkarılması için, 50 mM glisin-NaCl-NaOH tamponunda (pH: 10.5) 0-50 μg/ml tirozin içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonda tirozin içeren her bir çözeltiden 0.5 ml temiz tüplere aktarılarak üzerine 2.5 ml 0.5 M Na_2CO_3 ve iki kez seyreltilmiş Folin reaktifi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek 660 nm'deki absorbans değerleri (BioRad Smart Spec. 3000) okunmuştur. Tirozin miktarına bağlı olarak okunan 660 nm'deki absorbanslardan yararlanılarak, tirozin standart grafiği çizilmiştir. Bu eğriden

yararlanılarak örneklerdeki alkalen proteaz aktiviteleri hesaplanmıştır [59]. Tirozin standart grafiği Ek A'da verilmiştir.

3.2.2. Protein miktarının belirlenmesi

Protein miktarı sığır serum albumininin (BSA) standart olarak kullanıldığı (Ek A), Coomasie Blue Boyası Bağlama Yöntemi [59, 60] ile belirlenmiştir.

3.2.2.1. Protein standart grafiğinin hazırlanması

Protein standart grafiğinin oluşturulması için, 10 mg BSA 10 ml distile suda çözülmüştür. 1 mg/ml BSA çözeltisine 9 ml distile su eklenerek seyreltme yapılmıştır. Konsantrasyonu duyarlılık içinde kalan standartlar (5, 10, 15, 20, 25, 30 µg BSA/ml olacak şekilde) uygun sulandırma yapılarak hazırlanmıştır. (1 ml örnek üzerine 1 ml Coomasie Blue reaktifi eklendikten sonra karışımın 595 nm'deki absorbans değeri (BioRad Smart Spec. 3000) ölçülmüştür. Elde edilen verilerden aşağıdaki formül yardımıyla protein miktarı hesaplanmıştır. Protein standart grafiği Ek A'da verilmiştir.

$$\text{Protein (mg/ml)} = \frac{\text{OD}_{595}}{\text{Eğim}} \times \text{Seyreltme faktörü}$$

3.3. Alkalen Proteazın Termal İnaktivasyonunun İncelenmesi

3.3.1. Alkalen proteazın sıcaklık stabilitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

Metal iyonlarının etkisini belirlemek amacı ile spesifik aktivitesi 3135 U/mg ve protein konsantrasyonu 0,155 mg/ml olan enzim çözeltisi kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki $CaCl_2$ ve $CuCl_2$ metal iyonlarının enzim stabilitesi üzerine etkisi incelenmiştir. $CaCl_2$ için 1-5 mM, $CuCl_2$ için 1,2,3,4,5,6 ve 10 mM konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Metal iyonlarını yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda içeren 0.5 ml'lik enzim çözeltileri 50°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında buz banyosunda soğutulup oda sıcaklığına getirilen enzim çözeltilerine 2.5 ml yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda $CaCl_2$ ve

$CuCl_2$ içeren 50 mM pH 10.5 glisin-NaOH tampondaki % 0.6'lık kazein eklenerek aktivite ölçümünde kullanılmıştır. Alkalen proteaz aktivitesi metal iyonları varlığı ve yokluğunda pH 10.5'de 30°C aralığında belirlenmiştir. 50ºC'de termal inaktivasyon sonunda geri kalan aktivite yüzdesine karşı çalışılan metal iyonu konsantrasyonları işaretlenerek enzime stabilizatör etkisi yapan metal iyonu konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.3.2. Alkalen proteazın termal inaktivasyonunun incelenmesinde substrat olarak Hammersten kazein kullanılması

Bacillus clausii GMBAE 42'den izole edilen Alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi için, 0.5 ml enzim solusyonu (50 mM pH 10.5 glisin-NaOH tamponda hazırlanmış, 928 U/mg spesifik aktivite, 0.070 mg/ml protein) 40, 45, 50, 55, 57.5, 60, 62.5 ve 65°C sıcaklıklarda değişen zaman aralıklarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda su banyosundan alınan örnekler buz banyosunda beş dakika bekletilmiş, oda sıcaklığına gelmeleri sağlanmıştır. Oda sıcaklığına gelmiş örneklere 2.5 ml 50 mM pH 10.5 glisin-NaOH-NaCl tampon içerisinde hazırlanan % 0.6'lık Hammersten kazein çözeltisinden ilave edilmiş ve 30°C'de başlangıç hızı koşullarında (5 dakika) tekrar su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon, ortama 2.5 ml trikloroasetik asit çözeltisi (0.11 M TCA, 0.22 M Na-asetat, 0.33 M asetik asit) ilave edilerek durdurulmuş ve 30 dakika 30°C'de yine su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karışım süzülerek alınmış, filtratın 0.5 ml'si üzerine 2.5 ml 0.5 M sodyum karbonat çözetisi ilave edilmiş ve karışıma 2 kat seyreltilmiş 0.5 ml Folin-Ciocalteau reaktifi ilave edilerek, karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorbans değerleri 660 nm'de (BioRad Smart Spec. 3000) ölçülerek geriye kalan enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

40, 45, 50, 55, 57.5, 60, 62.5 ve 65°C sıcaklıklarda ve değişen zaman aralıklarında yapılan ölçümler sonucu elde edilen aktivitelerin $Ln(Ei/E_0)$ değerleri hesaplanmıştır. Her bir sıcaklık değeri için, birinci mertebe tersinmez inaktivasyon kinetiğini ifade eden $Ln(Ei/E_0) = -k_i.t$ denklemine göre $Ln(Ei/E_0)$ değerlerine karşı t (zaman)

grafikleri oluşturulmuştur. Her bir sıcaklık için elde edilen doğru eğimlerinden enzim için inaktivasyon hız sabitleri (k_i) hesaplanmıştır.

$Ln(E_i/E_0) = -k_i . t$ denkleminde, E_0, native enzimin başlangıç aktivitesi, E_i, farklı sıcaklık ve sürelerde inaktive olmuş enzimin başlangıç aktivitesi, k_i, inaktivasyon hız sabiti (dak^{-1}), t: zaman (dak)'dır. Yarılanma ömrü ($t_{1/2}$), native enzimin 50%'sinin inaktivasyonu için gereken zamandır ve $Ln(E_i/E_0) = -k_i.t$ denklemine $E_0 = 2E_i$'nin yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır.

3.3.3. Alkalen proteazın termal inaktivasyonunun incelenmesinde substrat olarak kazein kullanılması

Bacillus clausii GMBAE 42'den izole edilen alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi için, 0.5 ml enzim çözeltisi (50 mM pH 10.5 glisin-NaOH tamponda hazırlanmış, 1515 U/mg spesifik aktivite, 0.132 mg/ml protein) 45, 50, 55, 60, 65°C sıcaklıklarda değişen zaman aralıklarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda su banyosundan alınan örnekler buz banyosunda beş dakika bekletilmiş, oda sıcaklığına gelmeleri sağlanmıştır. Oda sıcaklığına gelmiş örneklere 2.5 ml 50 mM pH 10.5 glisin-NaOH-NaCl tampon içerisinde hazırlanan % 0.6'lık kazein çözeltisinden ilave edilmiş ve 30°C'de başlangıç hızı koşullarında (5 dakika) tekrar su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon, ortama 2.5 ml trikloroasetik asit çözeltisi (0.11 M TCA, 0.22 M Na-asetat, 0.33 M asetik asit) ilave edilerek durdurulmuş ve 30°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karışım süzülerek filtratın 0.5 ml'si üzerine 2.5 ml 0.5 M sodyum karbonat çözetisi ilave edilmiş ve karışıma 2 kat seyreltilmiş 0.5 mL Folin-Ciocalteau reaktifi ilave edilerek, karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin 660 nm'deki absorbans değerleri (BioRad Smart Spec. 3000) ölçülerek yukarıda verilen yöntemle aktivite hesaplanmıştır.

45, 50, 55, 60, 65°C sıcaklıklarda ve değişen zaman aralıklarında yapılan ölçümler sonucu elde edilen aktivitelerin $Ln(E_i/E_0)$ değerleri hesaplanmıştır. Her bir sıcaklık değeri için, (2.10) denklemine göre $Ln(E_i/E_0)$ değerlerine karşı t (zaman) grafikleri

oluşturulmuştur. Her bir sıcaklık için elde edilen doğru eğimlerinden enzim için inaktivasyon hız sabitleri (k_i) hesaplanmıştır.

(2.10) denklemine göre, E_0, native enzimin başlangıç aktivitesini, E_i, farklı sıcaklık ve sürelerde inaktive olmuş enzimin başlangıç aktivitesini, k_i, inaktivasyon hız sabitini (dak^{-1}), t, zamanı (dak) ifade eder. Yarılanma ömrü ($t_{1/2}$), native enzimin % 50'sinin inaktivasyonu için gereken zamandır ve (2.11) denklemine hesaplanan k_i'lerin yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır.

3.3.4. Alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

Her bir sıcaklık için elde edilen inaktivasyon hız sabitlerinin (lnk_i) mutlak sıcaklığın resiprokal (1/T), (K^{-1}) değerlerine karşı çizilmesi ile oluşturulan doğru eğiminden alkalen proteaz enzimi için inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) hesaplanmıştır.

3.3.5. Alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Enzimin, Hammersten kazein ve kazein hidrolizinde her bir sıcaklık için (Hammersten kazein hidrolizinde 40, 45, 50, 55, 57.5, 60, 62.5, 65°C ve kazein hidrolizinde 45, 50, 55, 60, 65°C) hesaplanan inaktivasyon hız sabiti (k_i) değerleri (2.14) denkleminde yerine koyularak, her bir sıcaklık için enzimin inaktivasyonunun aktivasyon serbest enerjisi (ΔG_i) hesaplanmıştır. Yukarıda hesaplanan alkalen proteaz enzimi için inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) değeri (2.13) denkleminde yerine koyularak, her bir sıcaklık değeri için enzimin inaktivasyonunun entalpisi (ΔH_i) hesaplanmıştır. Her bir sıcaklık değeri için hesaplanan ΔG_i ve ΔH_i değerleri (2.15) denkleminde yerine koyularak, her bir sıcaklık için enzimin inaktivasyonunun entropisi (ΔS_i) hesaplanmıştır.

3.3.6. Alkalen proteaz enziminin kazein hidrolizi için Michaelis-Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Kazeinin farklı konsantrasyonlarında hazırlanmış (0.4-1.75 mg/ml) çözeltilerinden 2.5 ml alınarak, üzerine 0.5 ml enzim çözeltisi (spesifik aktivitesi 3135 U/mg ve protein konsantrasyonu 0.155 mg/ml) ilave edilerek 45, 50, 55, 60, 65°C sıcaklıklarda ve 5 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. Blank (kör) olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-Glisin tampon çözeltisi kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda farklı substrat konsantrasyonlarında enzim çözeltilerinin başlangıç hızları (3.1.6) bölümünde açıklanan aktivite tayin yönetimine göre belirlenmiştir. Daha sonra 45, 50, 55, 60, 65°C sıcaklıklarda, enzimin başlangıç hızlarının resiprokal değerlerine karşı (1/v) başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerleri (1/[S]) işaretlenerek Lineweaver-Burk diyagramları oluşturulmuştur. Bu diyagramlarda (1/v) ekseninin kesim noktası $1/V_m$ değerini, doğruların eğimi de K_m/V_m değerini verdiğinden bu değerlerden enzimin 45, 50, 55, 60, 65°C sıcaklıklarda K_m ve V_m değerleri bulunmuştur. Reaksiyon ortamındaki toplam enzim konsantrasyonu belirlenerek $V_m = k_{cat} . [E]_t$ denkleminden her sıcaklık için k_{cat} değerleri hesaplanmıştır.

3.3.7. Enzimin sıcaklık profili ve kazein hidrolizi için Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

Enzim çözeltisinden (spesifik aktivitesi 3135 U/mg ve protein konsantrasyonu 0.155 mg/ml) 0.5 ml alınarak üzerine 2.5 ml 50 mM pH 10.5 glisin-NaOH-NaCl tampon içerisinde hazırlanan % 0.6'lık kazein substrat çözeltisi ilave edilerek 45, 50, 55, 60, 65°C sıcaklıklarda 20 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. Blank olarak enzim çözeltisi yerine 50 mM pH 10.5 NaOH-Glisin tampon çözeltisi kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda kazein hidrolizi için enzimatik reaksiyon hızı (V) (3.1.6) bölümünde açıklandığı şekilde belirlenmiştir. Hız değerlerinin sıcaklık değerlerine karşı işaretlenmesi ile oluşturulan grafik enzimin optimal sıcaklık değerlerini göstermiştir. Daha sonra LnV değerlerine karşı bu mutlak sıcaklıkların tersleri (1/T) alınarak oluşturulan Arrhenius garfiği ile elde edilen lineer doğrunun eğiminden kazein hidrolizi için Arrhenius aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır.

3.3.8. Alkalen proteazla kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Enzimin farklı sıcaklıklardaki k_{cat} değerleri kullanılarak, kazein hidrolizinin aktivasyon serbest enerjisi ($\Delta G^{\#}$) (2.16) deklemine göre hesaplanmıştır. LnV değerlerine karşı her bir sıcaklığın resiprokal değerleri (1/T) işaretlenerek çizilmiş doğruların eğiminden hesaplanmış olan enzim için Arrhenius aktivasyon enerjisi kullanılarak, kazein hidrolizinin aktivasyon entalpisi ($\Delta H^{\#}$) (2.17) denklemince hesaplanmıştır. Hesaplanan bu $\Delta G^{\#}$ ve $\Delta H^{\#}$ değerleri (2.18) denkleminde yerine koyularak, kazein hidrolizinin aktivasyon entropisi ($\Delta S^{\#}$) hesaplanmıştır.

Farklı sıcaklıklarda bulunan K_m değerleri ve hesaplanmış olan k_{cat} değerleri (2.19) denkleminde yerine koyularak enzimin tranzisyon hali bağlama serbest enerjisi ($\Delta G_{E-T}^{\neq}$) hesaplanmıştır. Substrat bağlanmanın serbest enerjisi ($\Delta G_{E-S}^{\neq}$) ise farklı sıcaklıklarda bulunan K_m değerlerinin (2.20) denkleminde yerine koyulmasıyla hesaplanmıştır.

3.3.9. Cu^{2+} iyonları varlığında alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi

Cu^{2+} iyonlarıyla yapılan kinetik çalışmasında spesifik aktivitesi 3135 U/mg ve protein konsantrasyonu 0.155 mg/ml olan enzim çözeltisi kullanılmıştır.

5 mM $CuCl_2$ içeren 0.5 ml enzim çözeltisi farklı sıcaklıklarda (45-65ºC sıcaklık aralığında) farklı sürelerde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası enzim çözeltisi oda sıcaklığına getirilerek 2.5 ml %0.6'lık 5 mM $CuCl_2$ içeren kazein çözeltisi ile karıştırılmış 5 dakika süre ile 30°C'deki su banyosunda inkübasyona uğratılmıştır. Blank olarak enzim çözeltisi yerine uygun oranlarda seyreltilmiş 5 mM $CuCl_2$ içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-Glisin tampon çözeltisi kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda su banyosundan alınan reaksiyon karışımına 2.5 ml trikloroasetik asit çözeltisi ilave edilerek enzim tarafından dönüştürülemeyen substratın çöktürülmesi ile reaksiyon durdurulmuştur. Ardından trikloroasetik asit ilave edilmiş reaksiyon karışımı 30°C'de 30 dakika süre ile su banyosunda inkübe edilmiştir. Süre bitiminde

inkübasyondan alınan reaksiyon karışımı kaba filtre kağıdından süzülmüş ve deney tüpüne alınan 0.5 ml filtrat üzerine 2.5 ml 0.5 M Na_2CO_3 çözeltisi ilave edilip karıştırıldıktan sonra 0.5 ml Folin Ciocalteu reaktifi ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dakika süre ile bekletilen reaksiyon karışımında mavi rengin açığa çıkması beklenilmiştir. Oluşan rengin şiddeti 660 nm'de blanke karşı absorbansın ölçülmesi ile belirlenmiştir.

45, 50, 55, 60, 65°C sıcaklıklarda ve değişen zaman aralıklarında yapılan ölçümler sonucu elde edilen aktivitelerin bu sıcaklıklara ilişkin başlangıç aktivitelerine oranından $Ln(E_i/E_0)$ değerleri hesaplanmıştır. Her bir sıcaklık değeri için $Ln(E_i/E_0) = -k_i.t$ denklemine göre $Ln(E_i/E_0)$ değerlerine karşı t (zaman) grafikleri oluşturulmuştur. Her bir sıcaklık için elde edilen doğru eğimlerinden 5 mM $CuCl_2$ içeren enzimin inaktivasyon hız sabitleri (k_i) hesaplanmıştır.

3.3.10. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren alkalen proteazın termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

Her bir sıcaklık için elde edilen inaktivasyon hız sabitlerinin (lnk_i) mutlak sıcaklığın resiprokal (1/T) değerlerine karşı çizilmesi ile oluşturulan Arrhenius grafiğindeki lineer doğrunun eğiminden 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) hesaplanmıştır.

3.3.11. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren alkalen proteazın kazein hidrolizi için Michaelis-Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi

5 mM $CuCl_2$ içeren kazeinin farklı konsantrasyonlarında hazırlanmış (0.4-1.75 mg/ml) çözeltilerinden 2.5 ml alınarak, üzerine 5 mM $CuCl_2$ içeren 0.5 ml enzim solusyonu (spesifik aktivitesi 3135 U/mg ve protein konsantrasyonu 0.155 mg/ml) ilave edilerek 45-65°C sıcaklık aralığında 5 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. Blank (kör) olarak enzim çözeltisi yerine son konsantrasyonu 5 mM $CuCl_2$ içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-Glisin tampon çözeltisi kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda farklı substrat konsantrasyonlarında 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzim çözeltilerinin başlangıç hızları yukarıda anlatılan aktivite tayin yönetimine göre belirlenmiştir.

Daha sonra farklı sıcaklık ve farklı substrat başlangıç konsantrasyonlarında 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin başlangıç hızlarının resiprokal değerlerine karşı (1/v) başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerleri (1/[S]) işaretlenerek Lineweaver-Burk diyagramları oluşturulmuştur. Bu diyagramlarda (1/v) ekseninin kesim noktası $1/V_m$ değerini, doğruların eğimi de K_m/V_m değerini verdiğinden bu değerlerden 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin 45, 50, 55, 60 ve 65°C'deki K_m ve V_m değerleri bulunmuştur. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin reaksiyon ortamındaki toplam konsantrasyonu belirlenerek $V_m = k_{cat} . [E]_t$ denkleminden her sıcaklık için k_{cat} değerleri hesaplanmıştır.

3.3.12. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin sıcaklık profili ve kazein hidrolizi için Arrhenius aktivasyon enerjinin belirlenmesi

5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzim çözeltisinden (spesifik aktivitesi 3135 U/mg ve protein konsantrasyonu 0.155 mg/ml) 0.5 ml alınarak üzerine 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren 2.5 ml 50 mM pH 10.5 glisin-NaOH-NaCl tampon içerisinde hazırlanan % 0.6'lık $CuCl_2$' lü kazein çözeltisi ilave edilerek 45, 50, 55, 60, 65°C sıcaklıklarda 20 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. Blank olarak enzim çözeltisi yerine, son konsantrayonu 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren 50 mM pH 10.5 NaOH-Glisin tampon çözeltisi kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda kazein hidrolizi için enzimatik reaksiyon hızı (V) (3.3.7) bölümünde açıklandığı şekilde belirlenmiştir. Hız değerlerinin sıcaklık değerlerine karşı işaretlenmesi ile oluşturulan grafik 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin sıcaklık profilini gösterir. Daha sonra LnV değerlerine karşı bu mutlak sıcaklıkların resiprokal değerleri (1/T) alınarak oluşturulan Arrhenius grafiği ile elde edilen lineer doğrunun eğiminden 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin kazein hidrolizi için Arrhenius aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır.

3.3.13. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyonuna ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin, her bir sıcaklık için (45, 50, 55, 60, 65°C) hesaplanan inaktivasyon hız sabiti (k_i) değerleri (2.14) denkleminde yerine koyularak, her bir sıcaklık için 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin inaktivasyonunun

aktivasyon serbest enerjisi (ΔG_i) hesaplanmıştır. Yukarıda hesaplanan 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren alkalen proteaz enzimi için inaktivasyonunun Arrhenius aktivasyon enerjisi ($E_{a,i}$) değeri (2.13) denkleminde yerine koyularak, her bir sıcaklık değeri için 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin inaktivasyonunun entalpisi (ΔH_i) hesaplanmıştır. Her bir sıcaklık değeri için hesaplanan ΔG_i ve ΔH_i değerleri (2.15) denkleminde yerine koyularak, her bir sıcaklık için 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin inaktivasyonunun entropisi (ΔS_i) hesaplanmıştır.

3.3.14. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren alkalen proteazla kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin farklı sıcaklıklardaki k_{cat} değerleri kullanılarak, kazein hidrolizinin aktivasyon serbest enerjisi ($\Delta G^{\#}$) (2.16) deklemine göre hesaplanmıştır. LnV değerlerine karşı her bir sıcaklığın resiprokal değerleri (1/T) işaretlenerek çizilmiş doğruların eğiminden hesaplanmış 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzim için Arhenius aktivasyon enerjisi kullanılarak, kazein hidrolizinin aktivasyon entalpisi ($\Delta H^{\#}$) (2.17) denklemince hesaplanmıştır. Hesaplanan bu $\Delta G^{\#}$ ve $\Delta H^{\#}$ değerleri (2.18) denkleminde yerine koyularak, kazein hidrolizinin aktivasyon entropisi ($\Delta S^{\#}$) hesaplanmıştır.

Farklı sıcaklıklarda bulunan K_m değerleri ve hesaplanmış olan k_{cat} değerleri (2.19) denkleminde yerine koyularak enzimin tranzisyon hali bağlama serbest enerjisi ($\Delta G_{E\text{-}T}^{\neq}$) 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında hesaplanmıştır. Substrat bağlanmanın serbest enerjisi ($\Delta G_{E\text{-}S}^{\neq}$) ise farklı sıcaklıklarda bulunan K_m değerlerinin (2.20) denkleminde yerine koyulmasıyla hesaplanmıştır.

3.3.15. 5 mM Cu^{2+} iyonlarının alkalen proteaz üzerindeki aktivasyonuna ilişkin kinetik parametrelerin belirlenmesi

(A) 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında aktivasyonu, alkalen proteazın görünen K_m ve V_m değerleri (3.3.11) bölümünde açıklandığı şekilde Lineweaver-Burk diyagramı oluşturularak belirlenmiştir.

5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın k_{cat} değerleri hesaplanıp (2.21) denkleminde yerine koyularak, her bir sıcaklık için (45, 50, 55, 60, 65°C) β değerleri hesaplanmıştır. Her bir sıcaklık için çizilen aktivasyon için Lineweaver-Burk diyagramında, kontrol doğrusu ve metal iyonu içeren doğrunun kesiştiği doğrunun y eksenini kestiği noktanın koordinatı olan $1/V_m = (\alpha-1)/(\alpha-\beta)$ formülünde hesaplanan β değerleri yerine koyularak her bir sıcaklık için α değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan β ve α değerleri (2.25) denkleminde yerine koyularak her bir sıcaklık için K_A değerleri belirlenmiştir.

3.3.16. 5 mM Cu^{2+} yokluğunda ve varlığında alkalen proteazın otokatalitik hidrolizinin incelenmesi

Alkalen proteazın otolitik hidrolizi Coomasie Blue Boyası Bağlama Yöntemi [59, 60] ile protein tayini yapılarak belirlenmiştir.

5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzim çözeltisinden (spesifik aktivitesi 1914 U/mg ve protein konsantrasyonu 0.047 mg/ml) 1 ml alınarak 45, 50, 55, 60 ve 65°C'lik sıcaklıklarda farklı sürelerde inkübe edilmiştir. Blank olarak enzim çözeltisi yerine, son konsantrasyonu 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren 1 ml saf su kullanılmıştır. Su banyosunda farklı sıcaklık ve sürelerde inkübe edilmiş ve oda sıcaklığına getirilmiş metal iyonu ihtiva eden enzim çözeltisinin Coomasie Blue bağlama yöntemiyle protein konsantrasyonu belirlenmiştir. İnkübasyonlar sonunda belirlenen protein konsantrasyonu C_i başlangıç protein konsantrasyonu C_0 olarak kabul edilip $Ln(C_i/C_0)$ değerlerine karşı zamanın işaretlenmesinden elde edilen grafik ile enzimin birinci mertebeden mekanizmayla [$Ln(C_i/C_0) = - k_i \cdot t$ denklemi] otokatalitik hidrolize uğradığını göstermiştir. Grafikteki lineer doğruların eğiminden her bir sıcaklık için enzimin otokatalitik hidroliz hız sabiti hesaplanmıştır. $C_0 = 2C_i$ alınarak otokatalitik hidrolizin yarılanma ömrü belirlenmiştir. Aynı işlemler 5 mM Cu^{2+} içermeyen enzim için de tekrarlanmıştır.

4. SONUÇLAR

4.1. Alkalen Proteazın Termal İnaktivasyonunun İncelenmesi

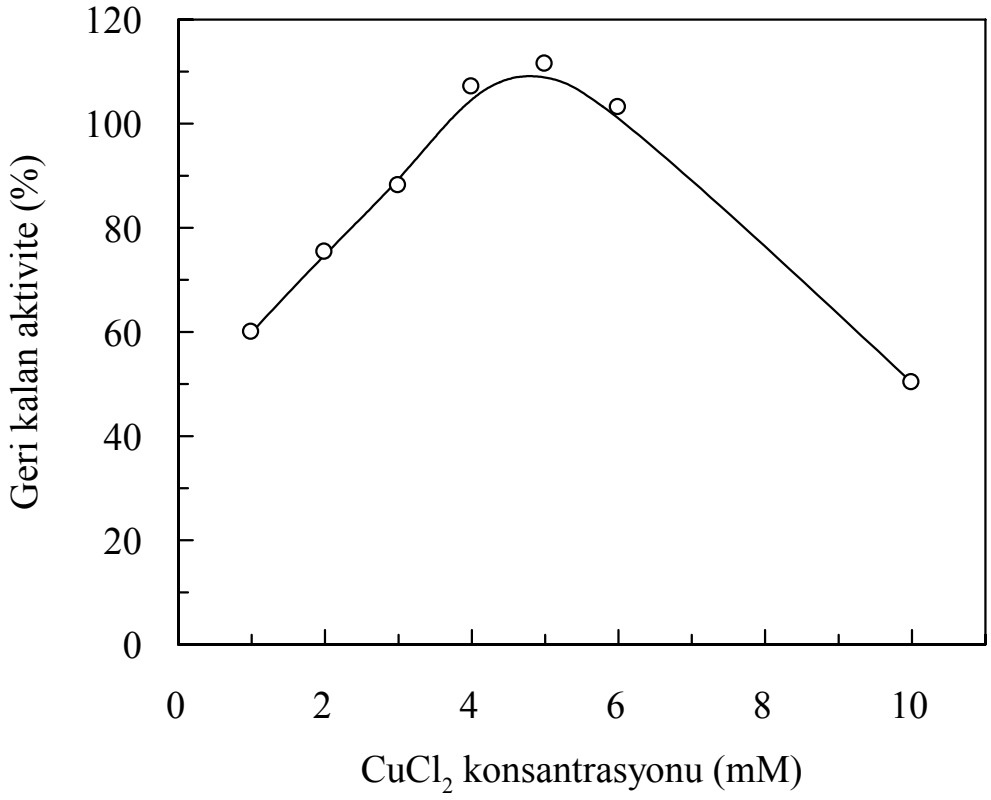
4.1.1. Metal iyonlarının alkalen proteaz üzerine etkisi

Enzimin değişik $CaCl_2$ ve $CuCl_2$ konsantrasyonlarında inkübasyonu sonucunda kalan aktivitesi tablo 4.1'de gösterilmiştir. 1-5 mM $CaCl_2$ ile yapılan çalışmalarda 2 mM konsantrasyondan sonra $CaCl_2$'ün ön inkübasyon esnasında çöktüğü gözlenmiştir. 2 mM $CaCl_2$ içeren enzimin 50°C'de 30 dakika inkübasyon sonunda geri kalan aktivitesi % 60 olarak bulunmuştur. 1-10 mM $CuCl_2$ içeren enzimin aynı koşullarda inkübasyonunda ise, 5 mM $CuCl_2$ konsantrasyonuna kadar enzim aktivitesi artan metal iyonu konsantrasyonu ile artmakta daha yüksek konsantrasyonlarda ise aktivite azalmaktadır..

Bakır iyonlarının 50°C'de 30 dakika inkübasyon sonunda enzimin kararlılığı üzerine etkisinin profili şekil 4.1'de görülmektedir. 5 mM Cu^{2+} varlığında enzim kararlılığını korumakta ve aktive olmaktadır.

Tablo 4.1: *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazı üzerine değişik metal iyonlarının etkisi

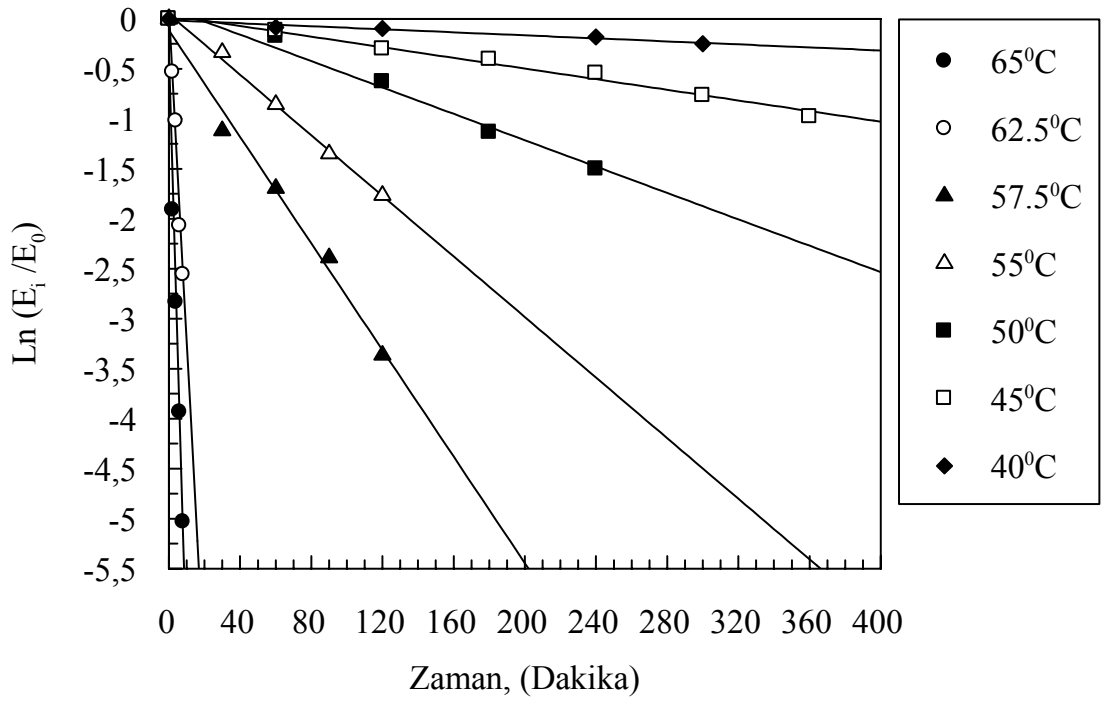
Metal iyonu	**Geri kalan enzim aktivitesi (%)**
Metal iyonu içermeyen enzim	100
1 mM $CaCl_2$	70
2 mM $CaCl_2$	60
1 mM $CuCl_2$	60
2 mM $CuCl_2$	75
3 mM $CuCl_2$	88
4 mM $CuCl_2$	107
5 mM $CuCl_2$	111
6 mM $CuCl_2$	103
10 mM $CuCl_2$	50



Şekil 4.1: Farklı konsantrasyonlardaki $CuCl_2$ çözeltilerinin alkalen proteaz enzimi üzerine etkisi

4.1.2. Alkalen proteaz enziminin termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi (Hammersten kazein substrat)

Alkalen proteaz enziminin inaktivasyon kinetiğinin incelenmesinde bölüm (3.3.2)'de açıklanan yöntem uygulanmıştır. Burada enzim çözeltisi 40, 45, 50, 55, 57.5, 60, 62.5 ve 65°C'lik sıcaklıklarda değişen zaman aralıklarında 50 mM pH 10.5 glisin-NaOH tamponu içerisinde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda kalan aktivite değerleri Hammersten kazein substrat olarak kullanılarak ölçülmüştür. Ölçülen bu değerlerin enzimin yukarıdaki sıcaklıklarda ölçülen başlangıç hızlarına oranı bulunmuştur. Bu oranın logaritmasının zamana karşı [$Ln(E_i/E_0)$ değerlerine karşı t, (zaman)] çiziminden elde edilen doğruların eğiminden her bir sıcaklığa ait inaktivasyon hız sabitleri belirlenmiştir. Ölçümler sonucu oluşturulan grafik şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2: Alkalen proteazın 40, 45, 50, 55, 57.5, 60, 62.5 ve 65°C'lerde inaktivasyon kinetiği (Hammersten kazein substrat, her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9849'dur)

Bu şekildeki doğruların eğiminden çalışılan sıcaklıklarda enzimin inaktivasyon hız sabitleri (k_i değerleri) ve bu değerler kullanılarak $t_{1/2} = 0.693 \; . \; k_i^{-1}$ bağıntısından yarılanma ömürleri belirlenmiştir. Sonuçlar tablo 4.2'de gösterilmiştir.

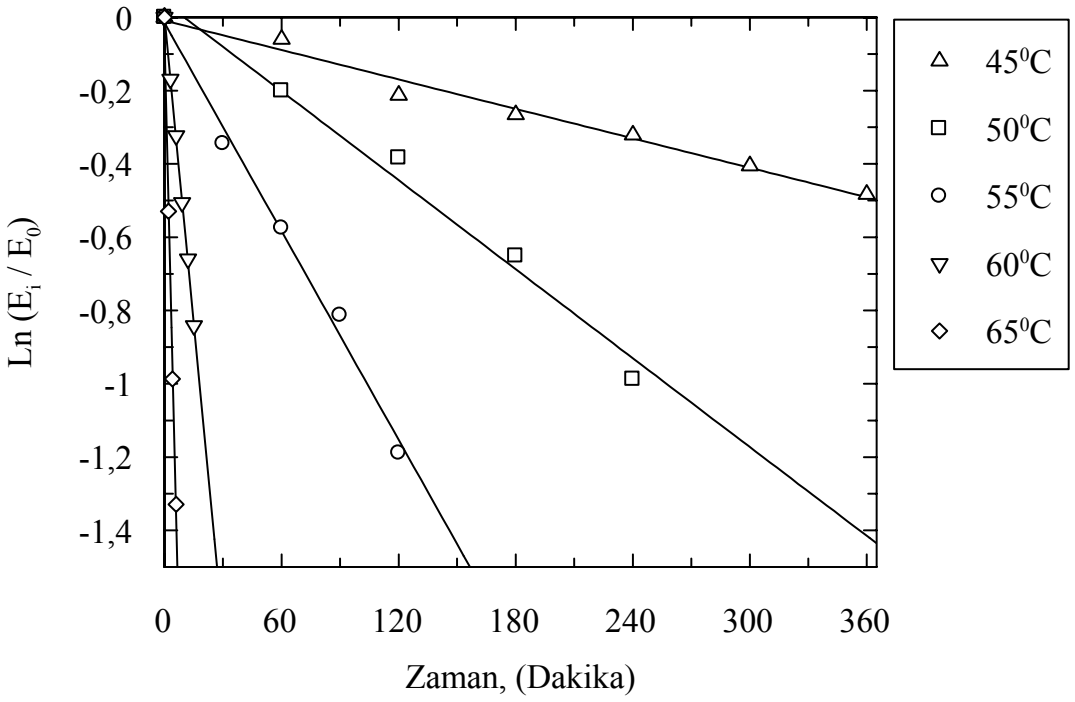
Tablo 4.2: *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının farklı sıcaklıklardaki inaktivasyon hız sabitleri ve yarılanma ömrü (Hammersten kazein substrat)

Sıcaklık, (ºC)	**İnaktivasyon hız sabiti (k_i) , (dak^{-1})**	**Yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) , (dak)**
40	0.00076	911.84
45	0.00266	260.53
50	0.0066	105.00
55	0.01515	45.74
57.5	0.02665	26.00
60	0.13632	5.08
62.5	0.33245	2.08
65	0.60425	1.15

Hammersten kazein substratının üretimi durdurulduğu için tez çalışmasına kazein substratı ile devam edilmiştir.

4.1.3. Alkalen proteazın termal inktivasyon kinetiğinin incelenmesi (Kazein substrat)

İnaktivasyon kinetiği bölüm (3.3.3)'de açıklanan yönteme göre çalışılmıştır. Enzim çözeltisi 45, 50, 55, 60 ve 65°C'lik sıcaklıklarda değişen sürelerde 50 mM pH 10.5 glisin-NaOH tamponu içinde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda kalan aktivite değerleri Kazein substrat olarak kullanılarak ölçülmüştür. Ölçülen bu değerlerin enzimin yukarıdaki sıcaklıklarda ölçülen başlangıç hızlarına oranı bulunmuştur. Bu oranın logaritmasının zamana karşı [$Ln(E_i/E_0)$ değerlerine karşı t, (zaman)] çiziminden elde edilen doğruların eğiminden her bir sıcaklığa ait inaktivasyon hız sabitleri belirlenmiştir. Ölçümler sonucu oluşturulan grafik şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3: Alkalen proteazın 45, 50, 55, 60 ve 65°C'lerde inaktivasyon kinetiği (Kazein substrat, her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9913'dür)

Bu şekildeki doğruların eğiminden çalışılan sıcaklıklarda enzimin inaktivasyon hız sabitleri (k_i değerleri) ve bu değerler kullanılarak bölüm (4.1.2)'de olduğu şekilde yarı ömür değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3: *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının farklı sıcaklıklardaki inaktivasyon hız sabitleri ve yarılanma ömrü (Kazein substrat)

Sıcaklık, (ºC)	**İnaktivasyon hız sabiti (k_i) , (dak^{-1})**	**Yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) , (dak)**
45	0.00134	517.0
50	0.00405	171.0
55	0.00948	73.0
60	0.05583	12.4
65	0.21673	3.2

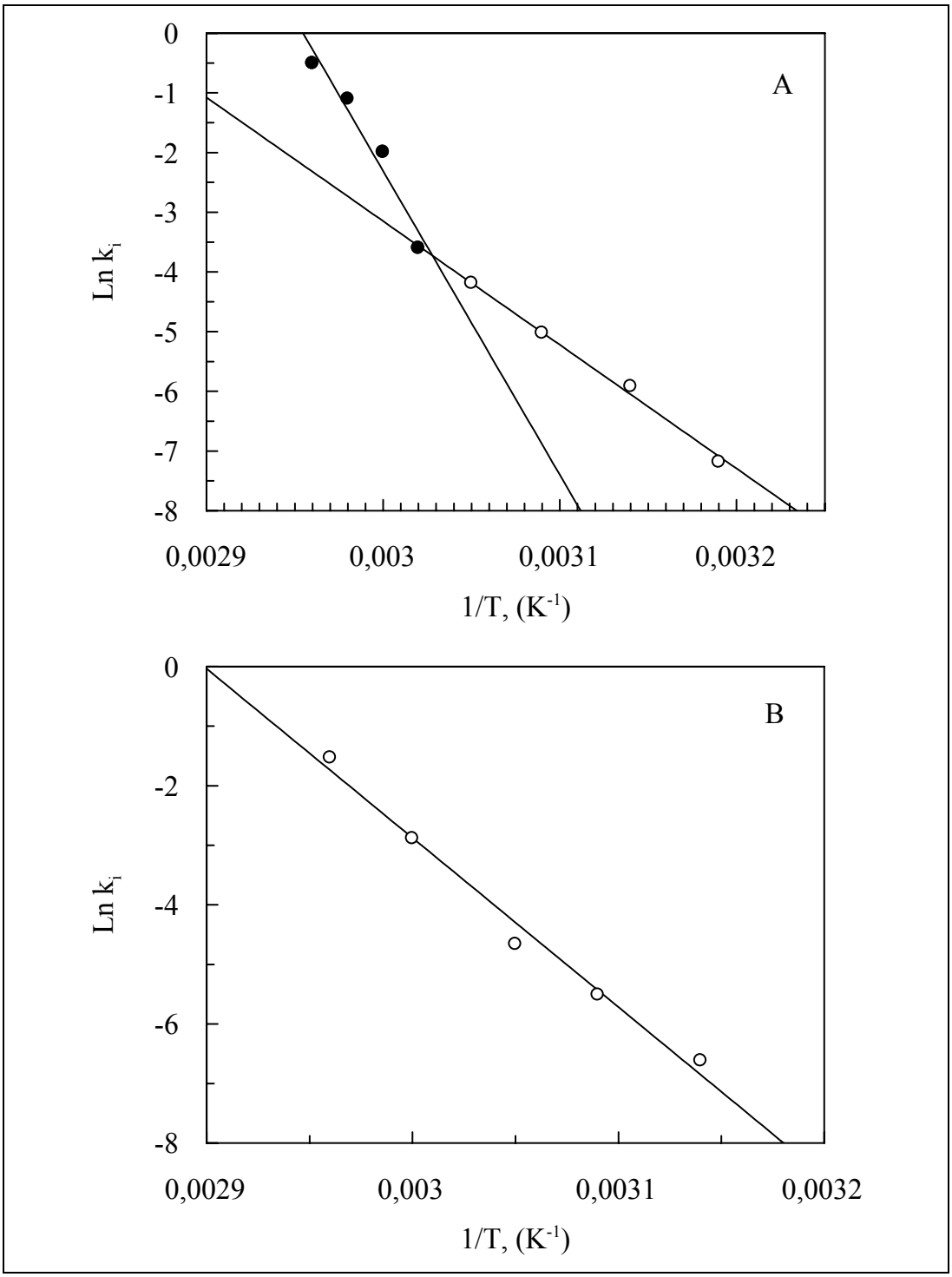
4.1.4. Alkalen proteaz enziminin inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

Bu amaçla Hammersten kazein substratı varlığında 40-65°C ve kazein substratı varlığında 45-65°C arasındaki sıcaklıklarda belirlenmiş enzime ait inaktivasyon hız sabitlerinin logaritmasının mutlak sıcaklığın resiprokal değerine karşı işaretlenmesiyle Arrhenius grafiği oluşturulmuştur (Hammersten kazein varlığında Şekil 4.4.(A) ve kazein varlığında Şekil 4.4.(B)).

Grafiklerdeki her bir doğrunun eğiminden enzim için termal inaktivasyonun aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler Hammersten kazein substrat olduğunda iki aşamalı inaktivasyon sonucu sırasıyla 171.700 ve 426.304 kJ/mol, kazein substrat olduğunda ise 23.623 kJ/mol olarak belirlenmiştir.

4.1.5. Alkalen proteazın termal inaktivasyonuna ilişkin hesaplanan termodinamik parametreler

Alkalen proteazın çalışılan sıcaklıklardaki irreversible termal inaktivasyonuna ilişkin entalpi (ΔH_i), serbest enerji (ΔG_i) ve entropi (ΔS_i) değerleri sırasıyla (2.12), (2.13) ve (2.14) denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Hammersten kazein substrat olması durumunda tablo 4.4'de kazein substrat olması durumunda tablo 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.4. *Bacillus clausii* alkalen proteazının termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjsinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius diyagramları, (A): Hammersten kazein substrat, (B): Kazein substrat (r değerleri ≥ 0.9746'dır)

Tablo 4.4: Alkalen proteazın termal inaktivasyonun termodinamik parametreleri (Hammersten kazein substrat)

Sıcaklık, (ºC)	**ΔG_i , (kJ mol^{-1})**	**ΔH_i , (kJ mol^{-1})**	**ΔS_i , (kJ mol^{-1} K^{-1})**
40	106.18	169.10	0.201
45	104.60	169.05	0.203
50	103.85	169.01	0.202
55	103.23	168.97	0.200
57.5	102.48	168.95	0.201
60	98.76	423.53	0.975
62.5	97.03	423.51	0.973
65	96.09	423.49	0.968

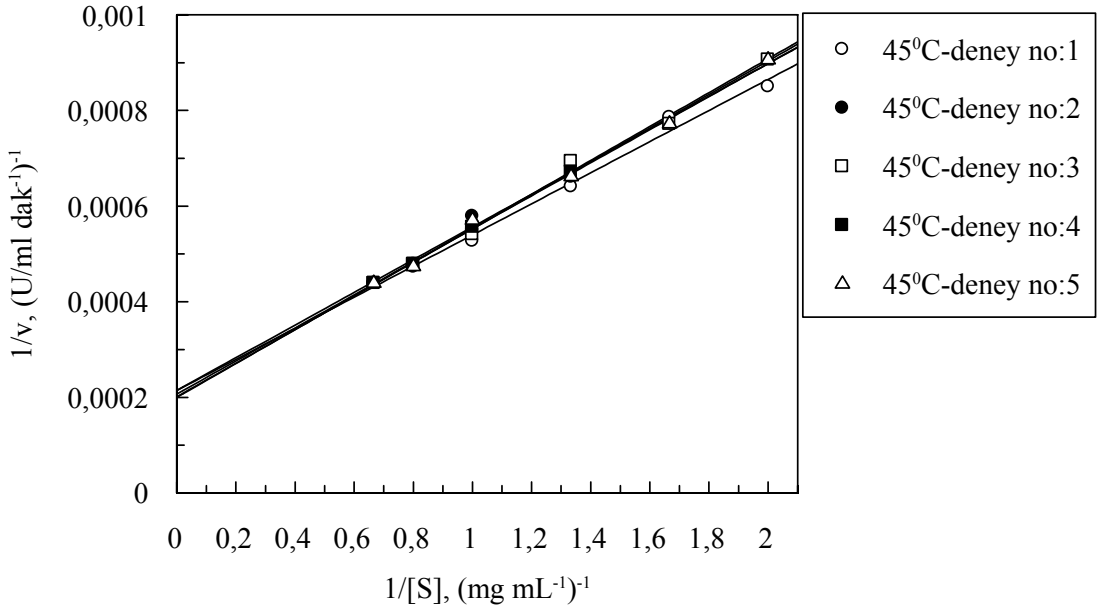
Tablo 4.5: Alkalen proteazın termal inaktivasyonun termodinamik parametreleri (Kazein substrat)

Sıcaklık, (ºC)	**ΔG_i , (kJ mol^{-1})**	**ΔH_i , (kJ mol^{-1})**	**ΔS_i , (kJ mol^{-1} K^{-1})**
45	106.42	233.58	0.400
50	105.16	233.54	0.404
55	104.51	233.50	0.405
60	101.23	233.46	0.416
65	98.98	233.42	0.423

4.1.6. Alkalen proteaz enziminin kinetik parametrelerinin belirlenmesi

Alkalen proteaz enziminin substratı olan kazeinin değişik konsantrasyonlarında 45-65°C arasındaki sıcaklıklarda inkübasyonu sonucu başlangıç hızlarının resiprokal değerlerine (1/v) karşı başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerinin (1/[S]) işaretlenmesiyle oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramları her bir sıcaklık için sırasıyla şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9'da verilmiştir.

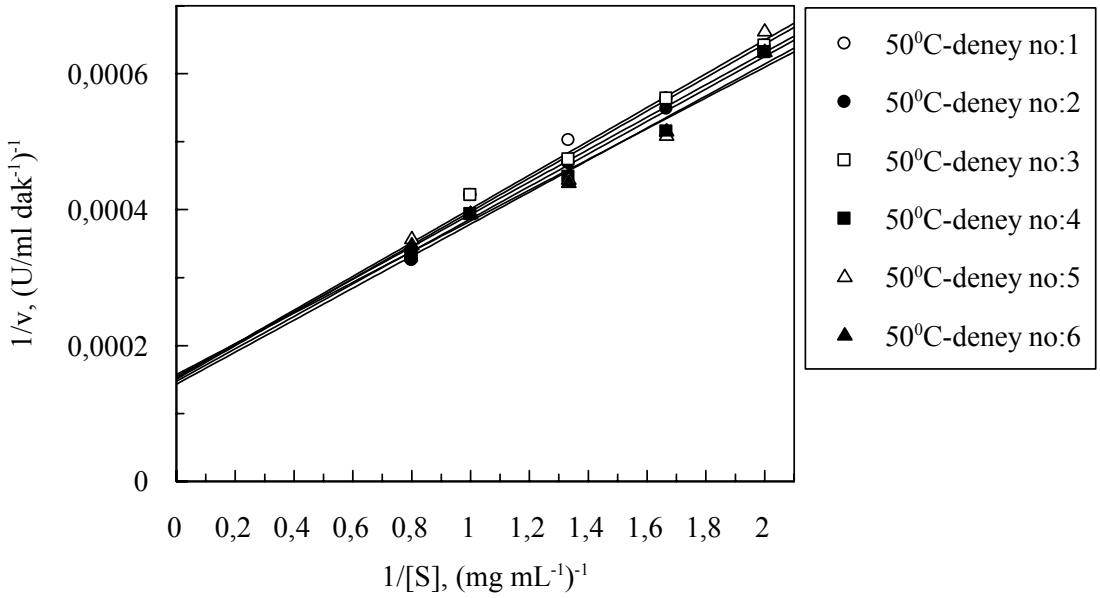
Her sıcaklıkta deneyler en az 5 kez tekrarlanmıştır. Her sıcaklık için yapılan deneyler sonucu belirlenen K_m ve V_m değerlerinin ortalamaları alınmış ve ortalamaların standart sapması hesaplanarak sonuçları sırasıyla tablo 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10'de verilmiştir.



Şekil 4.5: Alkalen proteazın 45ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9837'dir)

Tablo 4.6: Alkalen proteazın 45°C'de K_m ve V_m değerleri

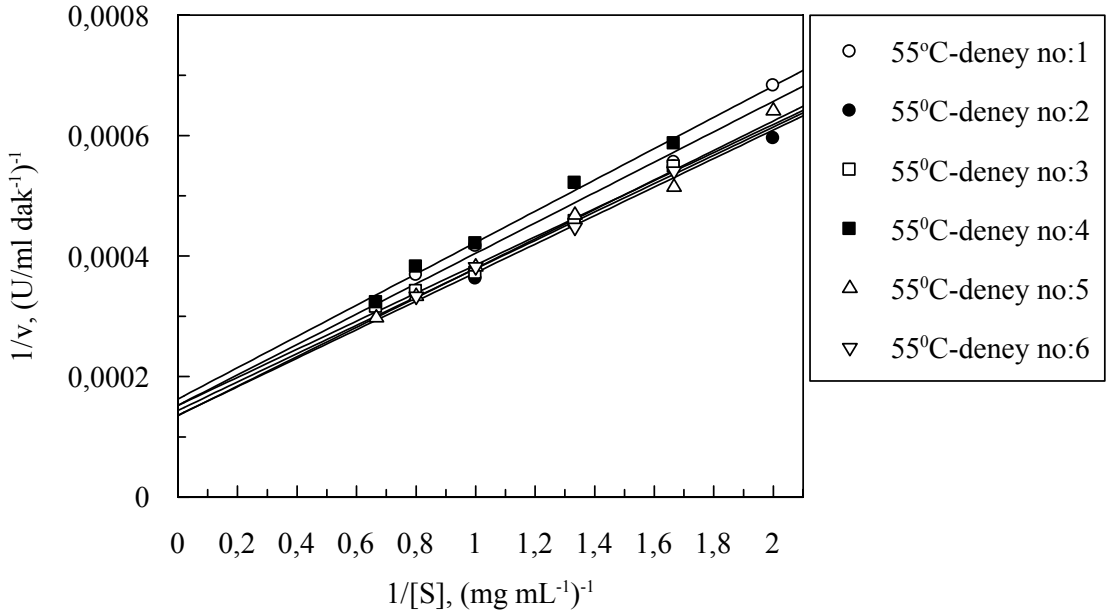
Deney no	**Vm, (µmol tirozin/ml/min)**	**Km, (mg/ml)**
1	26.28	1.57
2	26.28	1.62
3	27.60	1.75
4	27.60	1.75
5	26.28	1.67
$K_{m,ort}$: 1.67 $V_{m,ort}$: 26.81 $K_{m,sem}$: 0.036 $V_{m,sem}$: 0.32 Alkalen proteazın K_m, V_m değerleri sırasıyla 1.67±0.036 mg/ml, 26.81±0.32 µmol tirozin/ml/min		



Şekil 4.6: Alkalen proteazın 50ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9685'dir)

Tablo 4.7: Alkalen proteazın 50°C'de K_m ve V_m değerleri

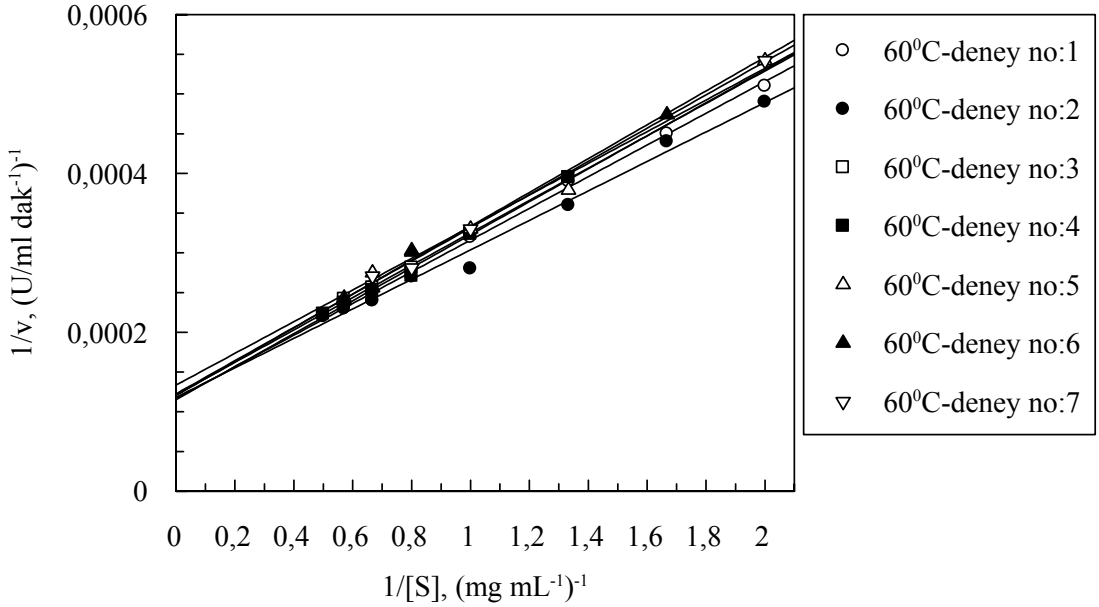
Deney no	**Vm, (µmol tirozin/ml/min)**	**Km, (mg/ml)**
1	36.79	1.667
2	36.79	1.600
3	36.79	1.667
4	39.42	1.710
5	36.79	1.600
6	36.79	1.600
$K_{m,ort}$: 1.64 $V_{m,ort}$: 37.23 $K_{m,sem}$: 0.020 $V_{m,sem}$: 0.44 Alkalen proteazın K_m, V_m değerleri sırasıyla 1.64±0.020 mg/ml, 37.23±0.44 µmol tirozin/ml/min		



Şekil 4.7: Alkalen proteazın 55ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9789'dir)

Tablo 4.8: Alkalen proteazın 55°C'de K_m ve V_m değerleri

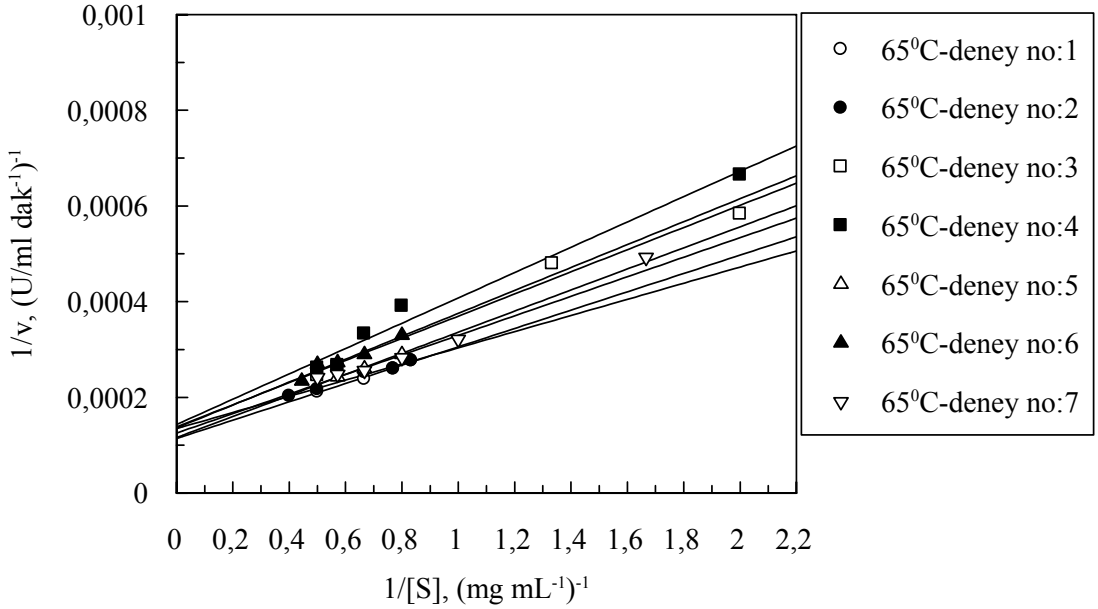
Deney no	Vm, (µmol tirozin/ml/min)	Km, (mg/ml)
1	36.79	1.67
2	39.42	1.71
3	36.79	1.53
4	34.49	1.63
5	39.42	1.71
6	39.42	1.71
$K_{m,ort}$: 1.66 $V_{m,ort}$: 37.73 $K_{m,sem}$: 0.029 $V_{m,sem}$: 0.83 Alkalen proteazın K_m, V_m değerleri sırasıyla 1.66±0.029 mg/ml, 37.73±0.83 µmol tirozin/ml/min		



Şekil 4.8: Alkalen proteazın 60ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9889'dir).

Tablo 4.9: Alkalen proteazın 60°C'de K_m ve V_m değerleri

Deney no	**Vm, (µmol tirozin/ml/min)**	**Km, (mg/ml)**
1	45.99	1.67
2	45.99	1.58
3	45.99	1.67
4	45.99	1.75
5	42.45	1.54
6	45.99	1.75
7	45.99	1.75
$K_{m,ort}$: 1.67 $V_{m,ort}$: 45.49 $K_{m,sem}$: 0.032 $V_{m,sem}$: 0.51 Alkalen proteazın K_m, V_m değerleri sırasıyla 1.67±0.032 mg/ml, 45.49±0.51 µmol tirozin/ml/min		



Şekil 4.9: Alkalen proteazın 65ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9699'dir).

Tablo 4.10: Alkalen proteazın 65°C'de K_m ve V_m değerleri

Deney no	Vm, (µmol tirozin/ml/min)	Km, (mg/ml)
1	50.17	1.82
2	42.45	1.31
3	39.42	1.64
4	39.42	1.86
5	42.45	1.54
6	39.42	1.71
7	45.99	1.83
$K_{m,ort}$: 1.67 $V_{m,ort}$: 45.49 $K_{m,sem}$: 0.075 $V_{m,sem}$: 1.54 Alkalen proteazın K_m, V_m değerleri sırasıyla 1.67±0.075 mg/ml, 45.49±1.54 µmol tirozin/ml/min		

Enzimin her bir sıcaklıktaki katalitik hız sabitleri (k_{cat} değerleri) her bir deney için $[E]_t$ = 0.00585 µmol/ml alınarak $V_m = k_{cat} . [E]_t$ bağıntısından hesaplanarak bunların ortalaması ve ortalamanın standart sapmaları hesaplanmıştır. Aynı yaklaşımlar katalitik performans değerlerinin (k_{cat}/K_m oranı) belirlenmesinde de uygulanmıştır. Aşağıdaki tablolar her bir sıcaklık için k_{cat} ve k_{cat}/K_m oranlarını da içermektedir.

Alkalen proteazın 45, 50, 55, 60 ve 65°C'lik sıcaklıklara ilişkin belirlenen K_m, V_m, k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin toplu sonuçları tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11: *Bacillus clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının farklı sıcaklıklarda kazein hidrolizi için belirlenmiş kinetik parametreleri

Sıcaklık (°C)	V_m (µmol tirozin/ml.dak)	K_m (mg/ml)	k_{cat} $(dak)^{-1}$	k_{cat}/K_m $dak^{-1}/(mg/ml)$
45	26.81 ± 0.32	1.67 ± 0.04	4583 ± 55	2744 ± 33
50	37.23 ± 0.44	1.64 ± 0.02	6365 ± 8	3881 ± 34
55	37.73 ± 0.83	1.66 ± 0.03	6450 ± 142	3887 ± 70
60	45.49 ± 0.51	1.67 ± 0.03	7777 ± 86	4655 ± 67
65	42.76 ± 1.54	1.67 ± 0.08	7311 ± 263	4420 ± 240

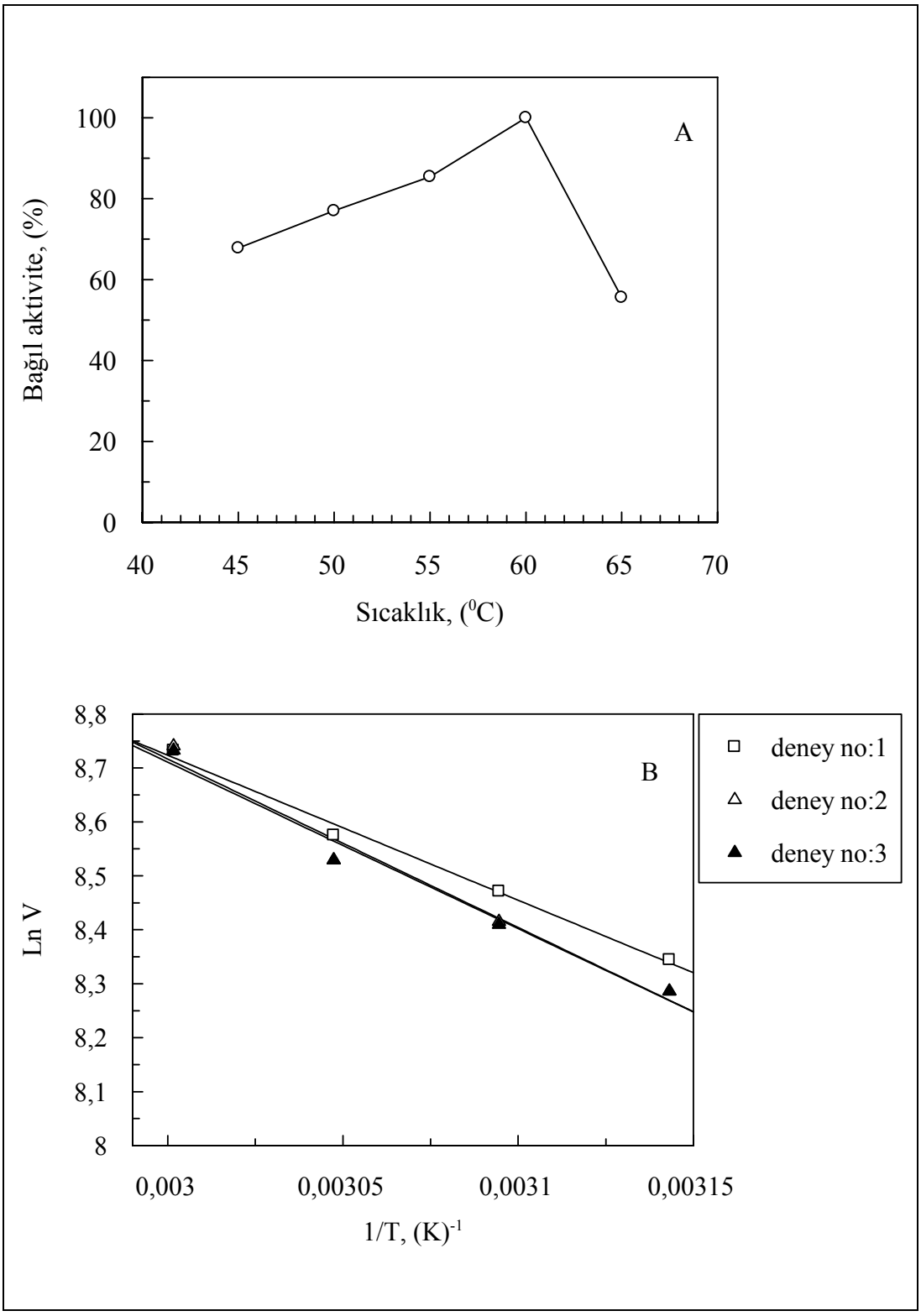
4.1.7. *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının sıcaklık profili ve kazein hidrolizi için Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

Alkalen proteazın sıcaklık profili şekil 4.10.(A)'da verilmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir.

Alkalen proteazın kazein hidrolizi için aktivasyon enerjisi 45, 50, 55 ve 60°C'lik sıcaklıklarda ölçülen başlangıç hızlarının logaritmik değerlerinin (LnV) mutlak sıcaklığın resiprokaline [1/T, (K^{-1})] karşı işaretlenmesiyle elde edilen Arrhenius diyagramındaki doğruların eğiminden hesaplanmıştır (Şekil 4.10.(B)). Buna göre alkalen proteaz enziminin aktivasyon enerjisi yapılan 3 denemenin ortalaması ve ortalamasının standart sapması alınarak 24.665 ± 1.163 kJ/mol kJ/mol olarak bulunmuştur (Tablo 4.12).

Tablo 4.12: Alkalen proteaz enziminin Arrhenius aktivasyon enerjisi

Deney no	Aktivasyon enerjisi, E_a (kJ/mol)
1	22.346
2	25.979
3	25.669
$E_{a,ort}$: 24.665 $E_{a,sem}$: 1.163 Alkalen proteazın aktivasyon enerjisi, E_a = 24.665 ± 1.163 kJ/mol	



Şekil 4.10: *B. clausii* alkalen proteazın sıcaklık profili (A) ve Arrhenius aktivasyon enerji grafiği, her bir doğru için r ≥ 9879'dur (B)

4.1.8. *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazı ile farklı sıcaklıklardaki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreler

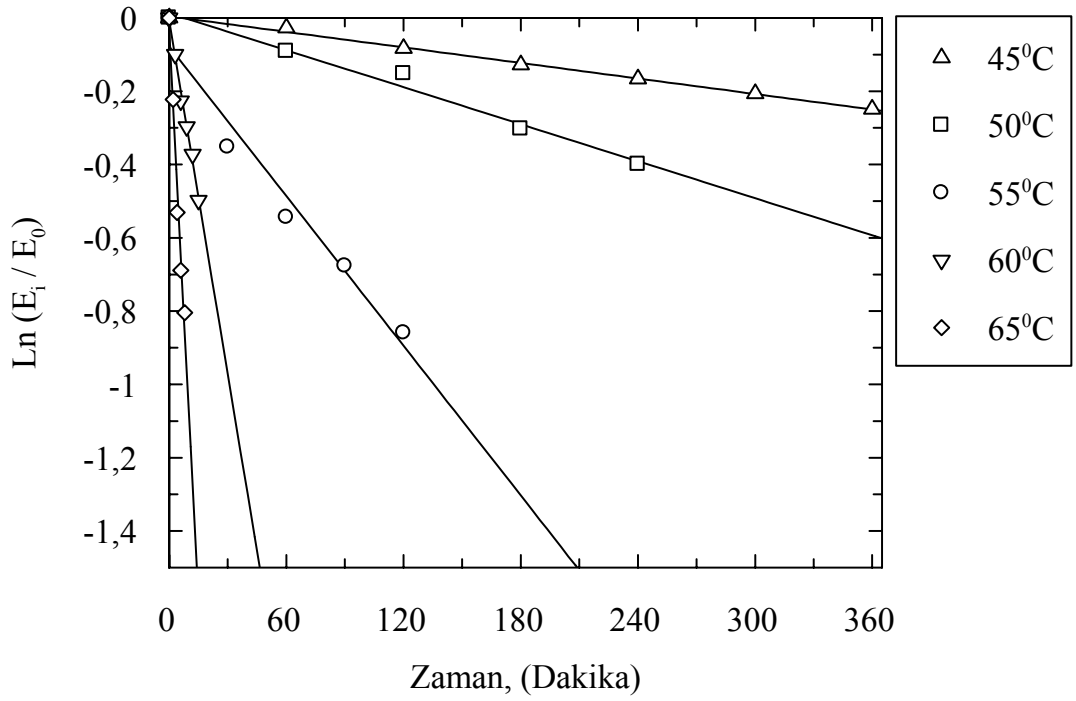
B. clausii GMBAE 42 alkalen proteazının katalizlediği kazein hidroliz reaksiyonunun değişik sıcaklıklardaki katalitik hız sabiti (k_{cat}), aktivasyon serbest enerjisi ($\Delta G^{\#}$), aktivasyon entalpisi ($\Delta H^{\#}$), aktivasyon entropisi ($\Delta S^{\#}$), kazein bağlanması için tranzisyon hali serbest enerjisi ($\Delta G_{E\text{-}T}^{\#}$), ve kazein bağlanma serbest enerjisi ($\Delta G_{E\text{-}S}^{\neq}$) termodinamik değerleri sırasıyla (2.16), (2.17), (2.18), (2.19), (2.20) nolu denklemler kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar tablo 4.13'de verilmiştir.

Tablo 4.13: *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazı ile farklı sıcaklıklardaki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreler

Sıcaklık (ºC)	**$\Delta G^{\neq}$ (kJ mol^{-1})**	**$\Delta H^{\neq}$ (kJ mol^{-1})**	**$\Delta S^{\neq}$ (kJ mol^{-1} K^{-1})**	**$\Delta G^{\neq}_{E\text{-}T}$ (kJ mol^{-1})**	**$\Delta G^{\neq}_{E\text{-}S}$ (kJ mol^{-1})**
45	66.621	22.020	-0.140	20.942	1.356
50	66.827	21.978	-0.139	22.202	1.329
55	67.867	21.927	-0.140	22.549	1.383
60	68.425	21.885	-0.140	23.394	1.420
65	69.667	21.843	-0.141	23.571	1.442

4.1.9. 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında alkalen proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin incelenmesi

5 mM $CuCl_2$ içeren *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının inaktivasyon kinetiğinin incelenmesinde bölüm (3.3.9)'daki yöntemler uygulanmıştır. Burada 45, 50, 55, 60 ve 65°C sıcaklıklarda değişen zaman aralıklarında 5 mM $CuCl_2$ içeren enzim çözeltisi 50 mM pH 10.5 glisin-NaOH tamponu içerisinde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda kalan aktivite değerleri ölçülmüştür. Ölçülen bu değerlerin 5 mM $CuCl_2$ içeren enzimin yukarıdaki sıcaklıklarda ölçülen başlangıç hızlarına oranı bulunmuştur. Bu oranın logaritmasının zamana karşı [$Ln(E_i/E_0)$ değerlerine karşı t, (zaman)] çiziminden elde edilen doğruların eğiminden her bir sıcaklığa ait inaktivasyon hız sabitleri belirlenmiştir. 45, 50, 55, 60 ve 65°C için zamana karşı inaktivasyon kinetikleri şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11: 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 45, 50, 55, 60 ve 65°C'lerde inaktivasyon kinetiği (her bir doğrunun r değeri ≥ 0.9855'dir)

Bu şekillerdeki doğruların eğiminden çalışılan sıcaklıklarda enzimin inaktivasyon hız sabitleri (k_i değerleri) ve bu değerler kullanılarak bölüm (4.3.3)'de olduğu şekilde yarı ömür değerleri ($t_{1/2}$) belirlenmiştir. Sonuçlar tablo 4.14'de gösterilmiştir.

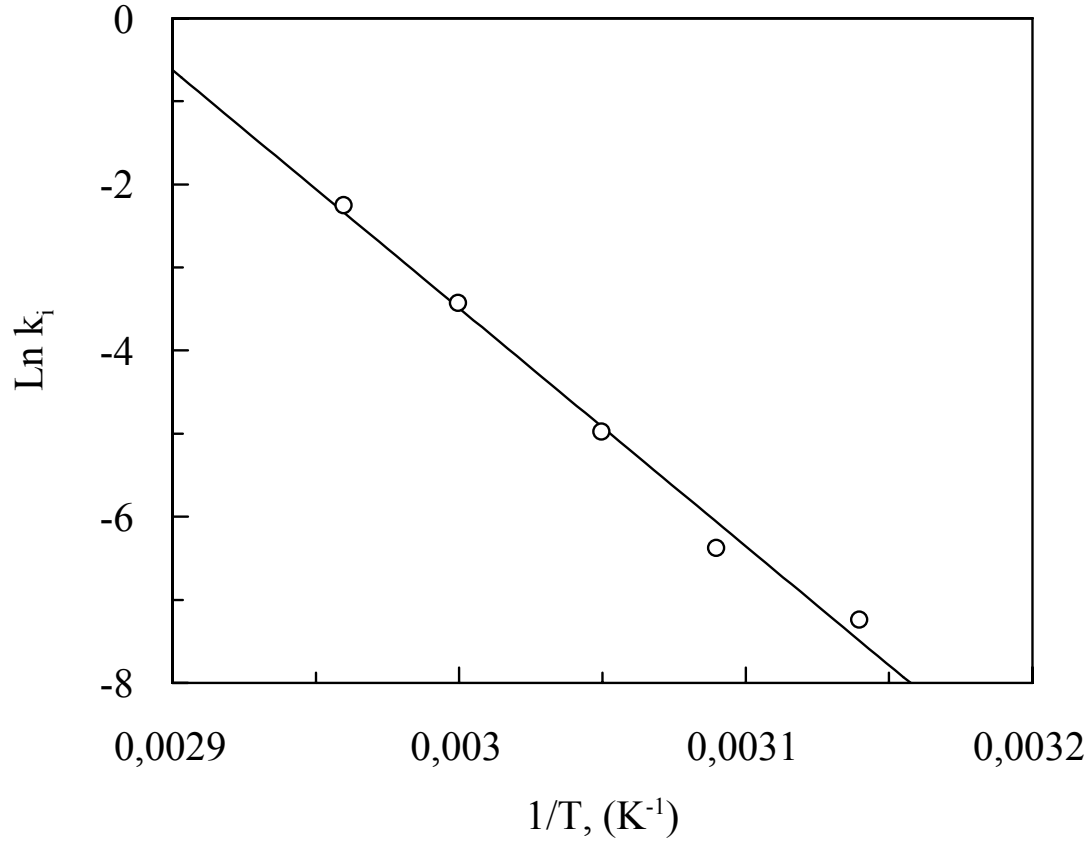
Tablo 4.14: *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında farklı sıcaklıklardaki inaktivasyon hız sabitleri (k_i) ve yarı ömür değerleri ($t_{1/2}$)

Sıcaklık, (ºC)	**İnaktivasyon hız sabiti, (k_i) (dak^{-1})**	**Yarılanma ömrü, ($t_{1/2}$) (dak)**
45	0.00071	976.0
50	0.00168	413.0
55	0.00681	102.0
60	0.03215	21.6
65	0.10376	6.7

Alkalen proteazın 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında değişik sıcaklıklardaki yarılanma ömrü değerlerinin Cu^{2+} iyonları içermeyen enzimin değişik sıcaklıklardaki yarılanma ömrüne oranı stabilizasyon faktörü olarak tanımlanır. Buna göre 5 mM Cu^{2+} varlığında enzimin 45, 50, 55, 60 ve 65°C'lik sıcaklıklardaki termal kararlılığının sırasıyla 1.89, 2.42, 1.40, 1.74 ve 2.09 kat arttığı belirlenmiştir.

4.1.10. 5 mM $CuCl_2$ iyonları içeren alkalen proteaz enziminin inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

Bu amaçla 45-65°C arasındaki sıcaklıklarda belirlenen 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazın inaktivasyon hız sabitlerinin logaritmasının (ln k_i) mutlak sıcaklığın resiprokal değerine karşı (1/T) işaretlenmesiyle Arrhenius grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.12).

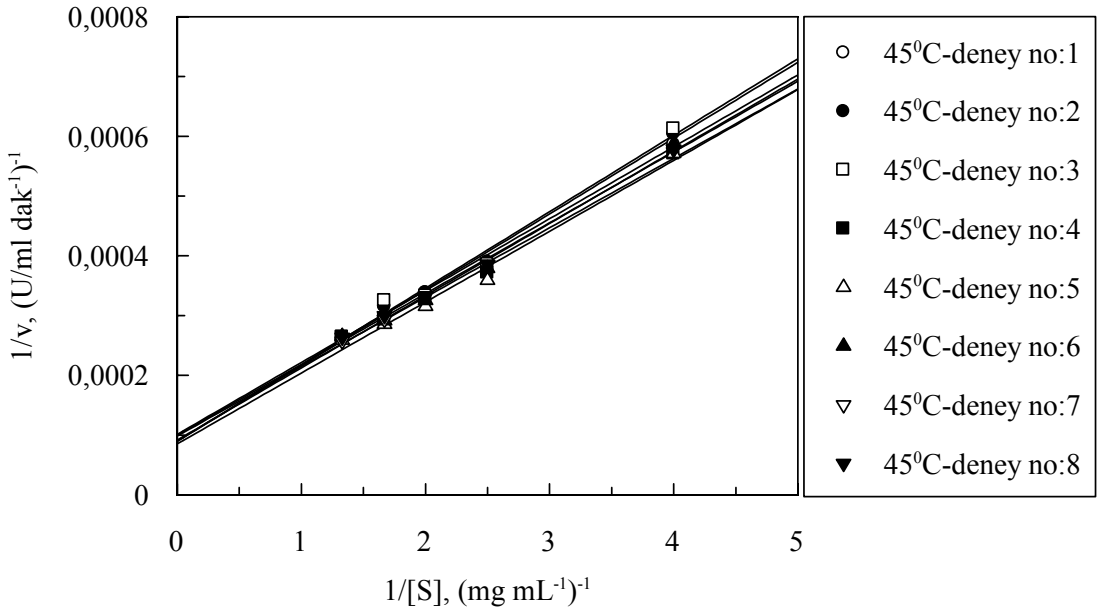


Şekil 4.12: *Bacillus clausii* alkalen proteazının 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında inaktivasyonunun aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde kullanılan Arrhenius diyagramı (r değeri 0.9947'dir)

Grafikteki doğrunun eğiminden 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında enzimin termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi 23.817 kJ/mol olarak belirlenmiştir.

4.1.11. 5 mM Cu^{2+}iyonları içeren alkalen proteazın kazein hidrolizi için Michaelis-Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesi

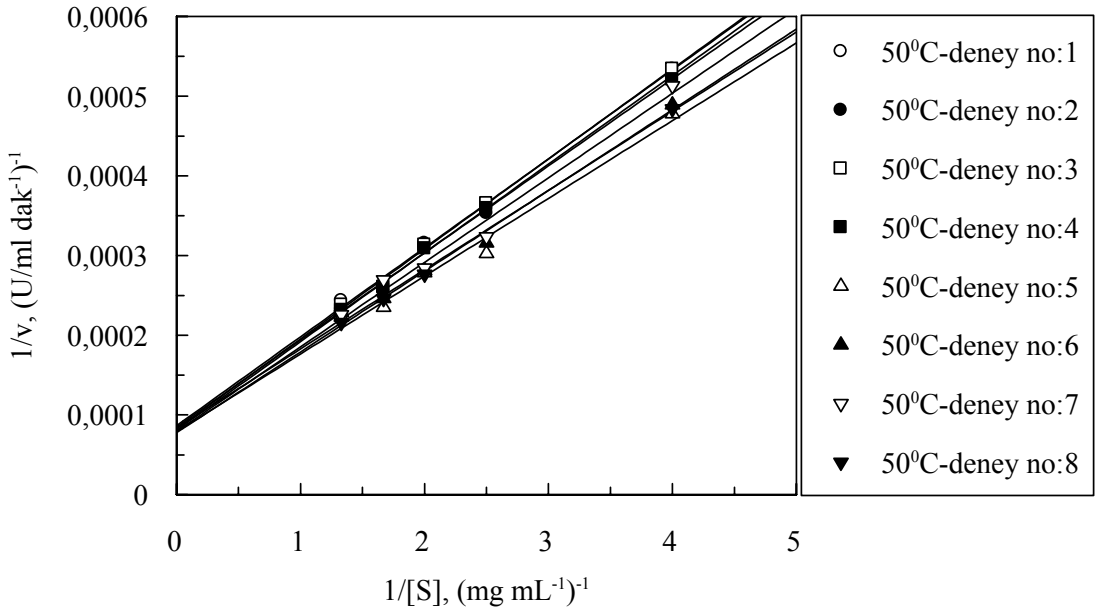
5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın substratı olan kazeinin değişik konsantrasyonlarında 45-65°C arasındaki sıcaklıklarda inkübasyonu sonucu başlangıç hızlarının resiprokal değerlerine (1/v) karşı başlangıç substrat konsantrasyonlarının resiprokal değerlerinin (1/[S]) işaretlenmesiyle oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramları her bir sıcaklık için sırasıyla şekil 4.13, 4.14, 4.15, 4.16 ve 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.13: 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 45ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9907'dir)

Tablo 4.15: 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 45°C'de K_m ve V_m değerleri

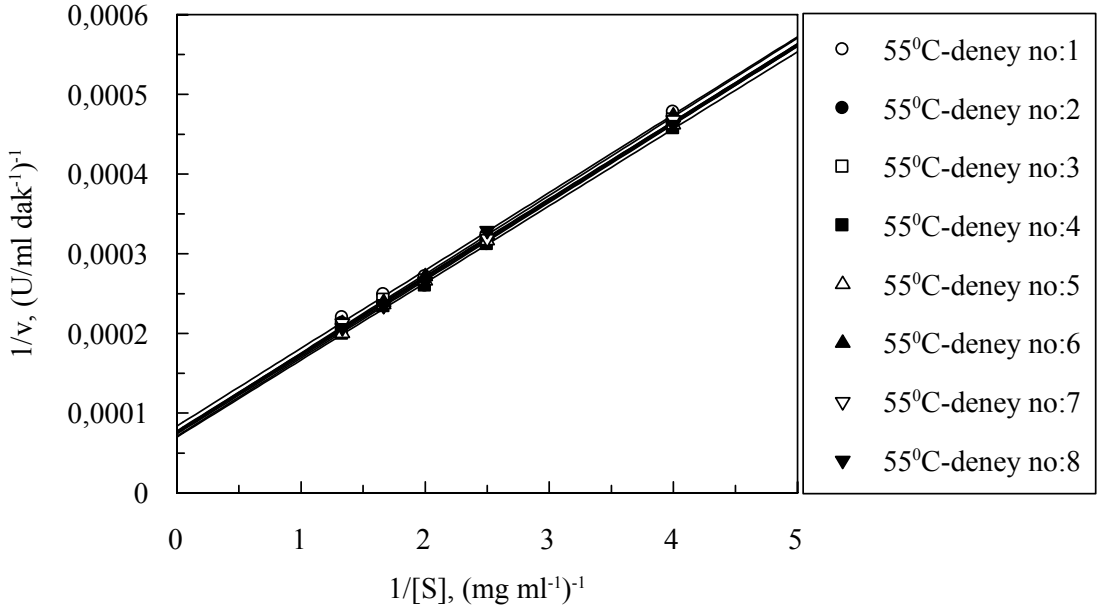
Deney no	Vm, (µmol tirozin/ml/min)	Km, (mg/ml)
1	55.19	1.20
2	61.32	1.44
3	61.32	1.44
4	55.19	1.20
5	61.32	1.33
6	61.32	1.33
7	61.32	1.33
8	55.19	1.20
$K_{m,ort}$: 1.31 $V_{m,ort}$:59.13 $K_{m,sem}$: 0.025 $V_{m,sem}$: 0.81 Cu^{2+} içeren alkalen proteazın K_m, V_m değerleri sırasıyla 1.31±0.025 mg/ml, 59.13±0.81 µmol tirozin/ml/min		



Şekil 4.14: 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 50ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9912'dir).

Tablo 4.16: 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 50°C'de K_m ve V_m değerleri

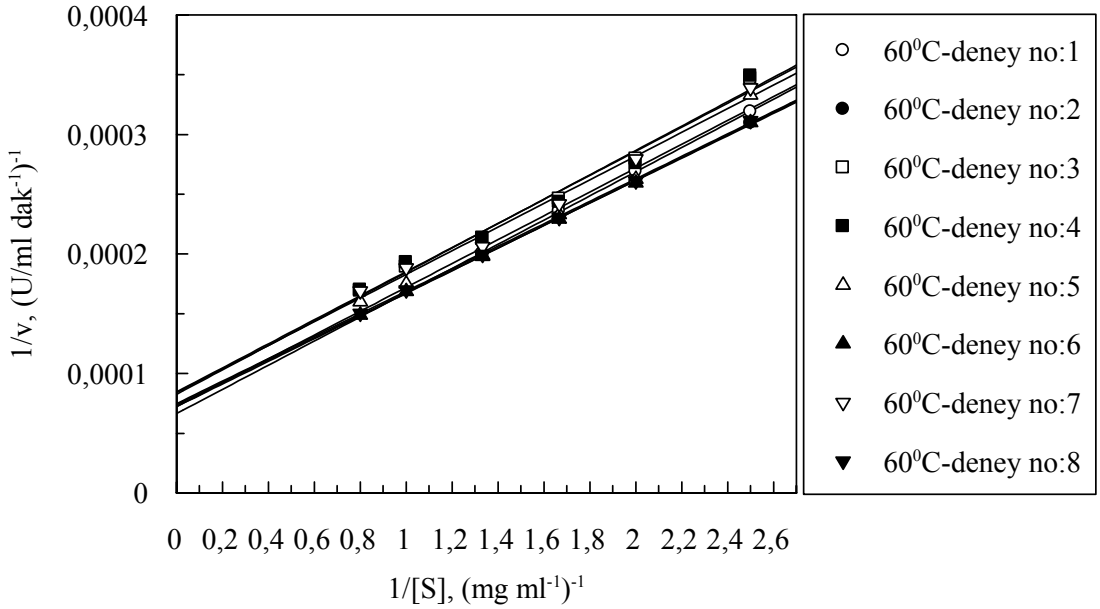
Deney no	**Vm, (µmol tirozin/ml/min)**	**Km, (mg/ml)**
1	61.32	1.22
2	68.99	1.38
3	68.99	1.38
4	68.99	1.38
5	68.99	1.25
6	68.99	1.25
7	68.99	1.38
8	68.99	1.25
$K_{m,ort}$: 1.31 $V_{m,ort}$: 68.03 $K_{m,sem}$: 0.026 $V_{m,sem}$: 0.96 Cu^{2+} içeren alkalen proteazın K_m, V_m değerleri sırasıyla 1.31±0.026 mg/ml, 68.03±0.96 µmol tirozin/ml/min		



Şekil 4.15: 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 55ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9974'dir)

Tablo 4.17: 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 55°C'de K_m ve V_m değerleri

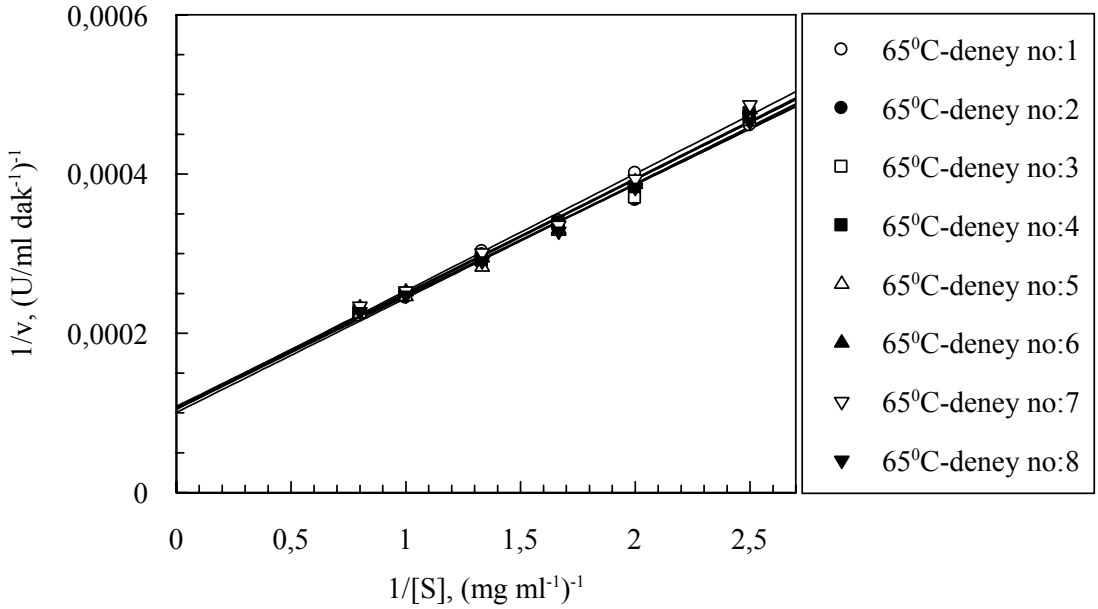
Deney no	**Vm (µmol tirozin/ml/min)**	**Km (mg/ml)**
1	68.99	1.25
2	78.84	1.43
3	68.99	1.25
4	78.84	1.43
5	78.84	1.43
6	68.99	1.25
7	68.99	1.25
8	68.99	1.25
$K_{m,ort}$: 1.32 $V_{m,ort}$: 72.68 $K_{m,sem}$: 0.033 $V_{m,sem}$: 1.80 Cu^{2+} içeren alkalen proteazın K_m, V_m değerleri sırasıyla 1.32±0.033 mg/ml, 72.68±1.80 µmol tirozin/ml/min		



Şekil 4.16: 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 60ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9889'dur)

Tablo 4.18: 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 60°C'de K_m ve V_m değerleri

Deney no	**Vm (µmol tirozin/ml/min)**	**Km (mg/ml)**
1	78.84	1.43
2	78.84	1.29
3	68.99	1.25
4	68.99	1.25
5	78.84	1.43
6	78.84	1.29
7	68.99	1.25
8	78.84	1.29
$K_{m,ort}$: 1.31 $V_{m,ort}$: 75.15 $K_{m,sem}$: 0.027 $V_{m,sem}$: 1.80 Cu^{2+} içeren alkalen proteazın K_m, V_m değerleri sırasıyla 1.31±0.027 mg/ml, 75.15±1.80 µmol tirozin/ml/min		



Şekil 4.17: 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 65ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (her bir doğru için r≥9894'dür)

Tablo 4.19: 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın 65°C'de K_m ve V_m değerleri

Deney no	Vm (µmol tirozin/ml/min)	Km (mg/ml)
1	50.17	1.27
2	55.19	1.40
3	50.17	1.27
4	55.19	1.40
5	55.19	1.40
6	50.17	1.27
7	50.17	1.36
8	50.17	1.27
$K_{m,ort}$: 1.33 $V_{m,ort}$: 52.05 $K_{m,sem}$: 0.023 $V_{m,sem}$: 0.92 Cu^{2+} içeren alkalen proteazın K_m, V_m değerleri sırasıyla 1.32±0.033 mg/ml, 72.68±1.80 µmol tirozin/ml/min		

Her sıcaklıkta deneyler en az 8 kez tekrarlanmıştır. Her sıcaklık için yapılan deneyler sonucu belirlenen V_m ve K_m değerlerinin ortalamaları alınmış ve ortalamaların standart sapması hesaplanarak sonuçları sırasıyla tablo 4.15, 4.16, 4.17, 4.18 ve 4.19'da verilmiştir. Enzimin her bir sıcaklıktaki katalitik hız sabitleri (k_{cat} değerleri) her bir deney için $[E]_t$ = 0.00585 µmol/ml alınarak $V_m = k_{cat} . [E]_t$ bağıntısından hesaplanarak bunların ortalaması ve ortalamanın standart sapmaları hesaplanmıştır. Aynı yaklaşımlar katalitik performans değerlerinin (k_{cat}/K_m oranı) belirlenmesinde de uygulanmıştır. Yukarıdaki tablolar her bir sıcaklık için k_{cat} ve k_{cat}/K_m oranlarını da içermektedir.

5 mM Cu^{2+} iyonları içeren *B. clausii* alkalen proteazının 45, 50, 55, 60 ve 65°C'lik sıcaklıklara ilişkin K_m, V_m, k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin toplu sonuçları tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 4.20: 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının farklı sıcaklıklarda kazein hidrolizi için belirlenmiş kinetik parametreleri

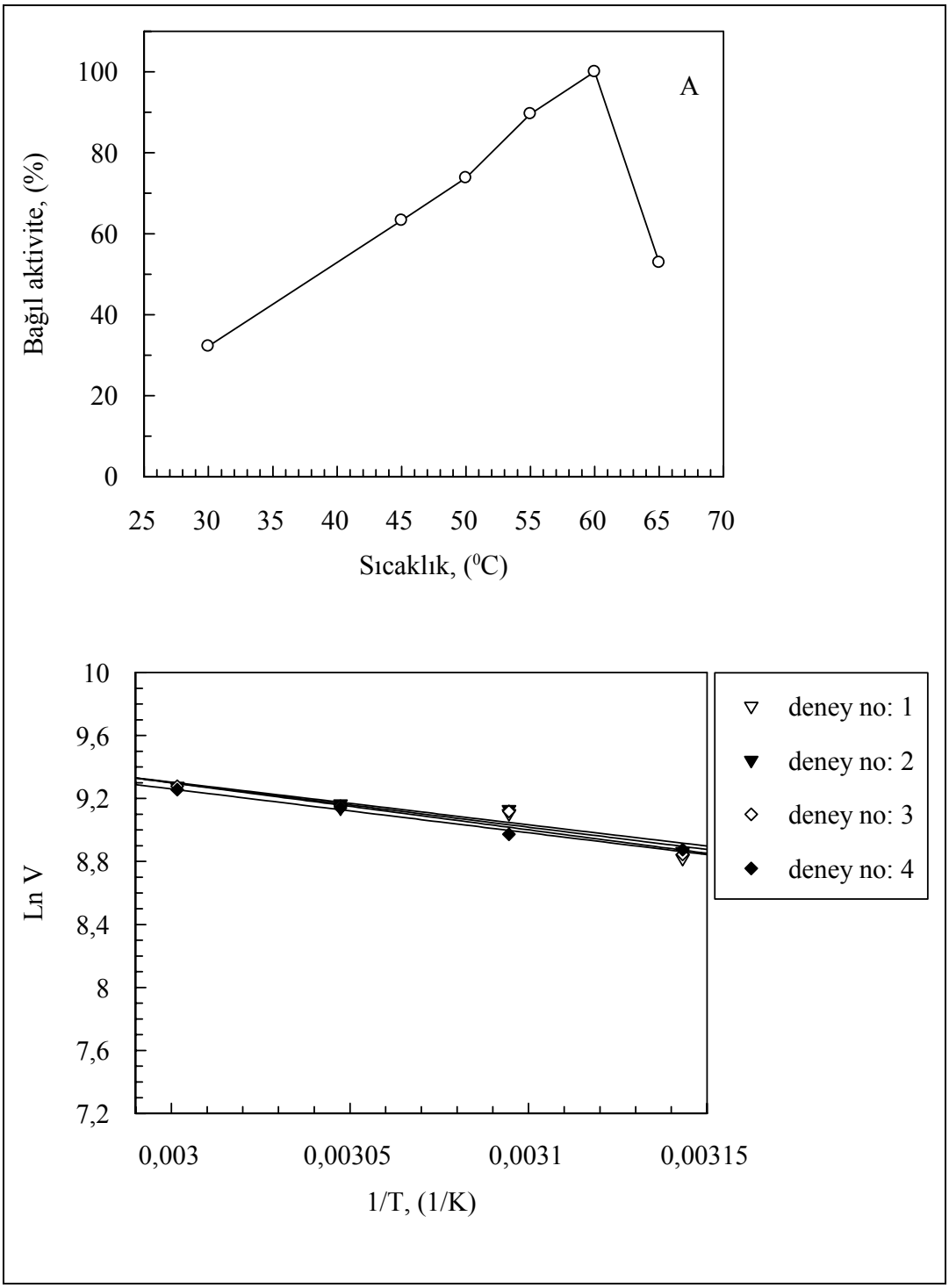
Sıcaklık (°C)	**V_m (µmol tirozin/ml.dak)**	**K_m (mg/ml)**	**k_{cat} $(dak)^{-1}$**	**k_{cat}/K_m $dak^{-1}/(mg/ml)$**
45	59.13 ± 0.81	1.31 ± 0.03	10110 ± 139	7747 ± 68
50	68.03 ± 0.96	1.31 ± 0.03	11631 ± 164	8886 ± 161
55	72.68 ± 1.80	1.32 ± 0.03	12427 ± 308	9432 ± 2
60	75.15 ± 1.80	1.31 ± 0.03	12848 ± 308	9814 ± 186
65	52.05 ± 0.92	1.33 ± 0.02	8900 ± 157	6693 ± 55

4.1.12. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının sıcaklık profili ve kazein hidrolizi için Arrhenius aktivasyon enerjisinin belirlenmesi

5 mM Cu^{2+} iyonları içeren *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının sıcaklık profili şekil 4.18.(A)'da verilmiştir. Enzimin Cu^{2+} iyonları varlığında optimal sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren alkalen proteazın kazein hidrolizi için aktivasyon enerjisi 45, 50, 55, 60 ve 65°C'lik sıcaklıklarda ölçülen başlangıç hızlarının logaritmik değerlerinin (LnV) mutlak sıcaklığın resiprokaline [1/T, (K^{-1})] karşı işaretlenmesiyle elde edilen Arrhenius doğrusu çiziminin eğiminden hesaplanmıştır (Şekil 4.18.(B)). Buna göre 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteaz enziminin aktivasyon enerjisi yapılan 4 denemenin ortalaması ve ortalamasının standart sapması alınarak 23.489 ± 0.492 kJ/mol olarak bulunmuştur (Tablo 4.21).

Tablo 4.21: 5 mM $CuCl_2$ içeren *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının aktivasyon enerjisi

Deney no	**Aktivasyon enerjisi, E_a (kJ/mol)**
1	24.822
2	22.497
3	23.532
4	23.107
$E_{a,ort}$: 23.489, $E_{a,sem}$: 0.492 5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteazın aktivasyon enerjisi, E_a = 23.489 ± 0.492 kJ/mol	



Şekil 4.18. 5 mM Cu^{2+} içeren *B. clausii* alkalen proteazın sıcaklık profili (A) ve Arrhenius aktivasyon enerji grafiği, her bir doğru için r ≥ 9754'dür (B)

4.1.13. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren *B. clausii* alkalen proteazın termal inaktivasyonuna ilişkin hesaplanan termodinamik parametreler

5 mM Cu^{2+} iyonları içeren alkalen proteazın çalışılan sıcaklıklardaki irreversible termal inaktivasyonuna ilişkin entalpi (ΔH_i), serbest enerji (ΔG_i) ve entropi (ΔS_i) değerleri sırasıyla (2.12), (2.13), (2.14) denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar tablo 4.22'de verilmiştir. Tablonun incelenmesinden çalışılan her sıcaklıkta metal iyonu ilave edilmiş enzimin ΔG_i ve ΔH_i değerlerinin artmasına, ΔS_i değerlerinin azalmasına neden olduğu görülmektedir.

Tablo 4.22: 5 mM Cu^{2+} iyonu içeren alkalen proteazın termal inaktivasyonun termodinamik parametreleri

Sıcaklık (ºC)	ΔG_i (kJ mol^{-1})	ΔH_i (kJ mol^{-1})	ΔS_i (kJ mol^{-1} K^{-1})
45	108.10	235.53	0.401
50	107.52	235.49	0.396
55	105.41	235.45	0.396
60	102.76	235.40	0.398
65	101.05	235.36	0.397

4.1.14. 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren B. clausii GMBAE 42 alkalen proteazı ile farklı sıcaklıklarda kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreler

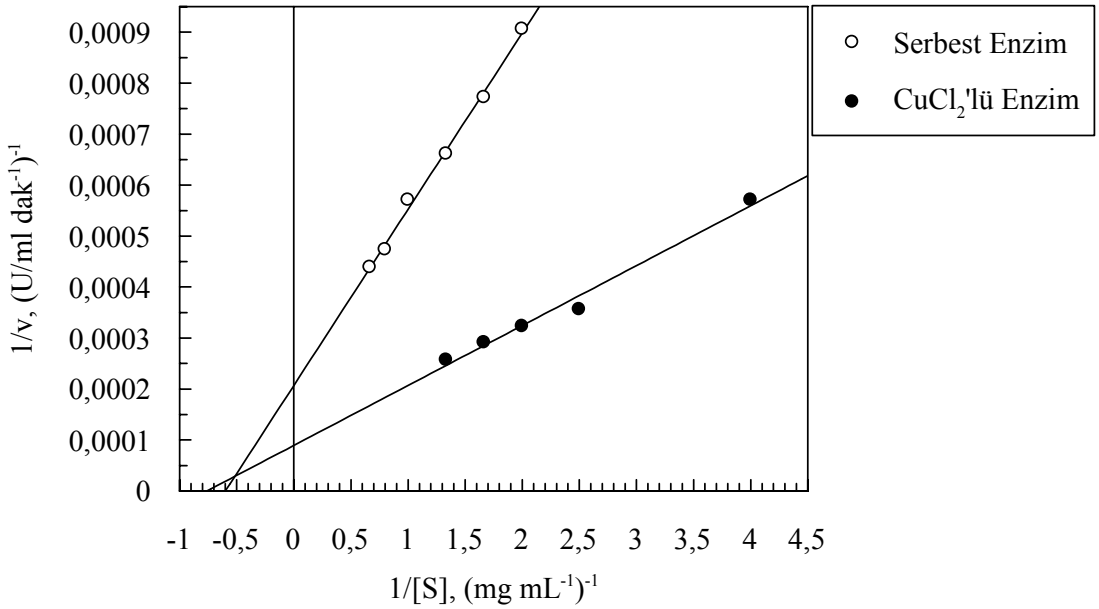
5 mM $CuCl_2$ içeren alkalen proteaz tarafından katalizlenen kazein hidroliz reaksiyonunun değişik sıcaklıklardaki aktivasyon serbest enerjisi ($\Delta G^{\#}$), aktivasyon entalpisi ($\Delta H^{\#}$), aktivasyon entropisi ($\Delta S^{\#}$), kazein bağlanması için tranzisyon hali serbest enerjisi ($\Delta G_{E\text{-}T}{}^{\#}$), ve kazein bağlanma serbest enerjisi ($\Delta G_{E\text{-}S}{}^{\neq}$) sırasıyla (2.16), (2.17), (2.18), (2.19), (2.20) nolu denklemler kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar tablo 4.23'de verilmiştir.

Tablo 4.23: 5 mM Cu^{2+} iyonu içeren alkalen proteazın farklı sıcaklıklardaki kazein hidrolizine ilişkin termodinamik parametreler

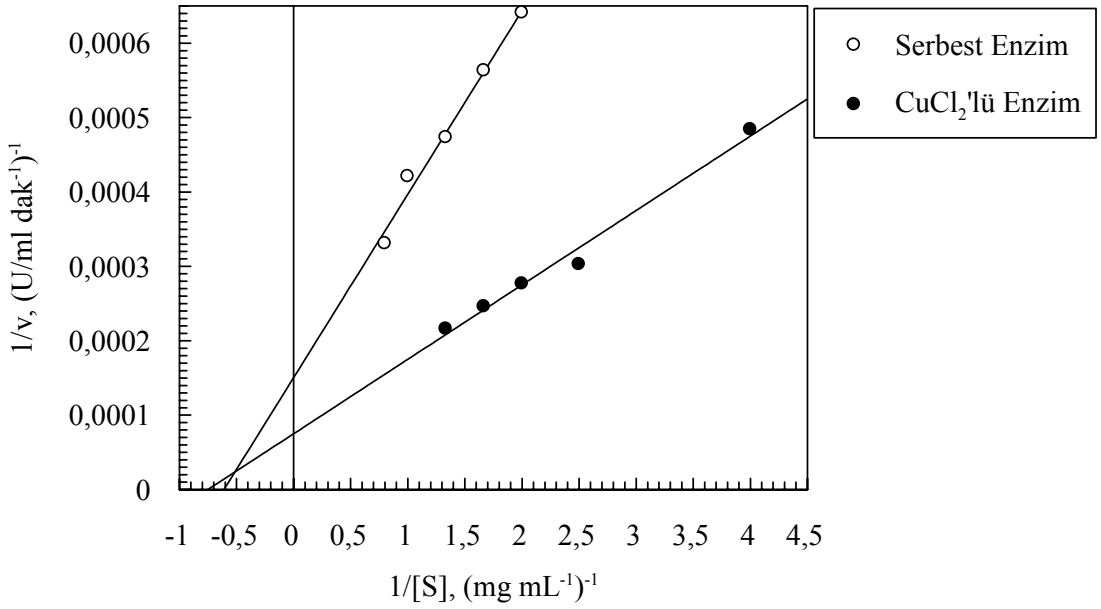
Sıcaklık (ºC)	$\Delta G^{\neq}$ (kJ mol^{-1})	$\Delta H^{\neq}$ (kJ mol^{-1})	$\Delta S^{\neq}$ (kJ mol^{-1} K^{-1})	$\Delta G^{\neq}_{E\text{-}T}$ (kJ mol^{-1})	$\Delta G^{\neq}_{E\text{-}S}$ (kJ mol^{-1})
45	64.528	20.844	-0.148	23.677	0.714
50	65.208	20.802	-0.147	24.426	0.725
55	66.078	20.761	-0.148	24.963	0.757
60	67.034	20.719	-0.148	25.457	0.748
65	69.115	20.678	-0.149	24.764	0.801

4.1.15. Alkalen proteazın 5 mM Cu^{2+} iyonları tarafından aktivasyonuna ilişkin kinetik parametreler

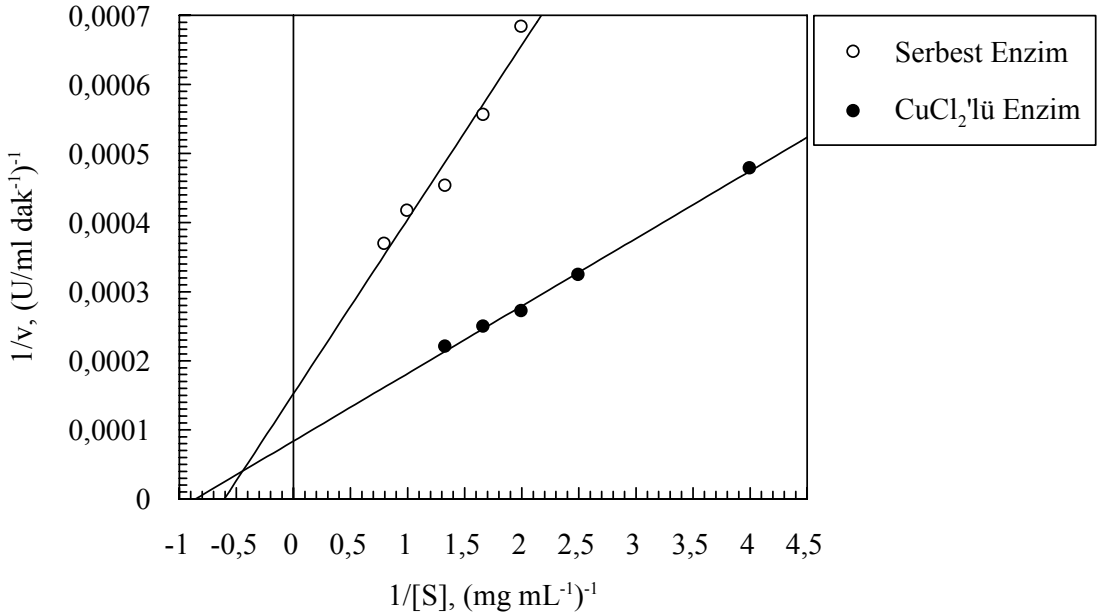
Alkalen proteazın 5 mM Cu^{2+} iyonlarının varlığında ve yokluğunda 45, 50, 55, 60 ve 65°C'lik sıcaklıklarda oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramları sırasıyla şekil 4.19, 4.20, 4.21, 4.22 ve 4.23'de gösterilmiştir.



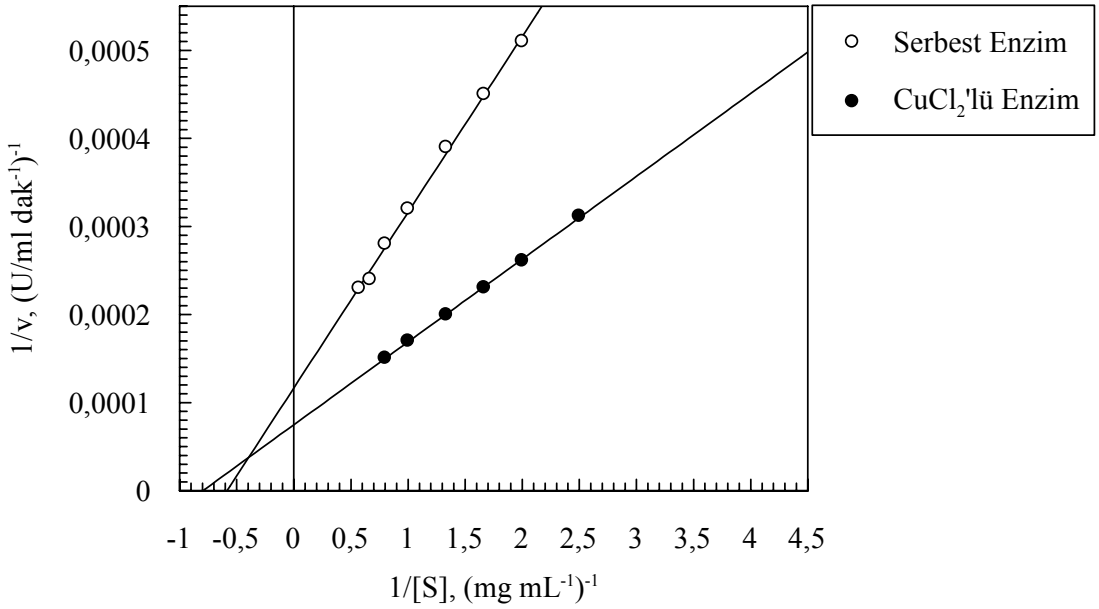
Şekil 4.19: 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın 45ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (iki doğrunun kesim noktasının y eksenindeki koordinatı 0.000028)



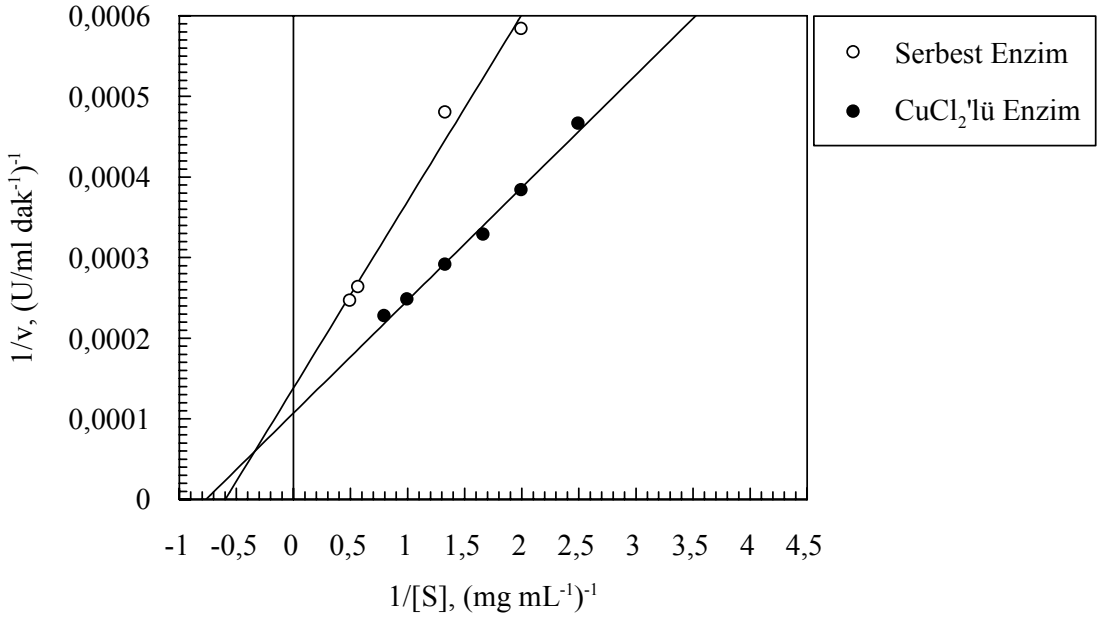
Şekil 4.20: 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın 50ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (iki doğrunun kesim noktasının y eksenindeki koordinatı 0.000025)



Şekil 4.21: 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın 55ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (iki doğrunun kesim noktasının y eksenindeki koordinatı 0.000040)



Şekil 4.22: 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın 60ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (iki doğrunun kesim noktasının y eksenindeki koordinatı 0.000040)



Şekil 4.23: 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın 65ºC için çizilen Lineweaver-Burk diyagramı (iki doğrunun kesim noktasının y eksenindeki koordinatı 0.000060)

Aktivasyon kinetiği söz konusu olduğunda her bir sıcaklıktaki aktivasyon doğrusundan belirlenen görünen V_m değerleri ve $[E]_t$ = 0.00585 µmol/ml toplam enzim konsantrasyonu dikkate alınarak görünen k_{cat} değerleri hesaplanmıştır.

Görünen k_{cat} değerleri ve serbest enzimin k_{cat} değerleri arasındaki $k_{cat,gör} = \beta \cdot k_{cat}$ bağıntısından her bir sıcaklık için β değerleri belirlenmiştir. Kontrol ve aktivasyon doğrularının kesim noktalarının y eksenindeki koordinatının $\frac{1}{V_m}\left(\frac{\alpha-1}{\alpha-\beta}\right)$ olduğu göz önüne alınarak her bir sıcaklıkta elde edilen β değerlerinin bu bağıntıda yerine konulması ile farklı sıcaklıklar için α değerleri de hesaplanmıştır. Her bir sıcaklığa ait α ve β değerleri (2.25) nolu denklemde yerine koyularak her bir sıcaklığa ilişkin Cu^{2+} iyonlarının neden olduğu K_A sabitleri belirlenmiştir. Sonuçlar toplu olarak tablo 4.24'de verilmiştir.

Tablo 4.24: Alkalen proteazın 5 mM $CuCl_2$ varlığında aktivasyonunun değişik sıcaklıklardaki kinetik parametreleri

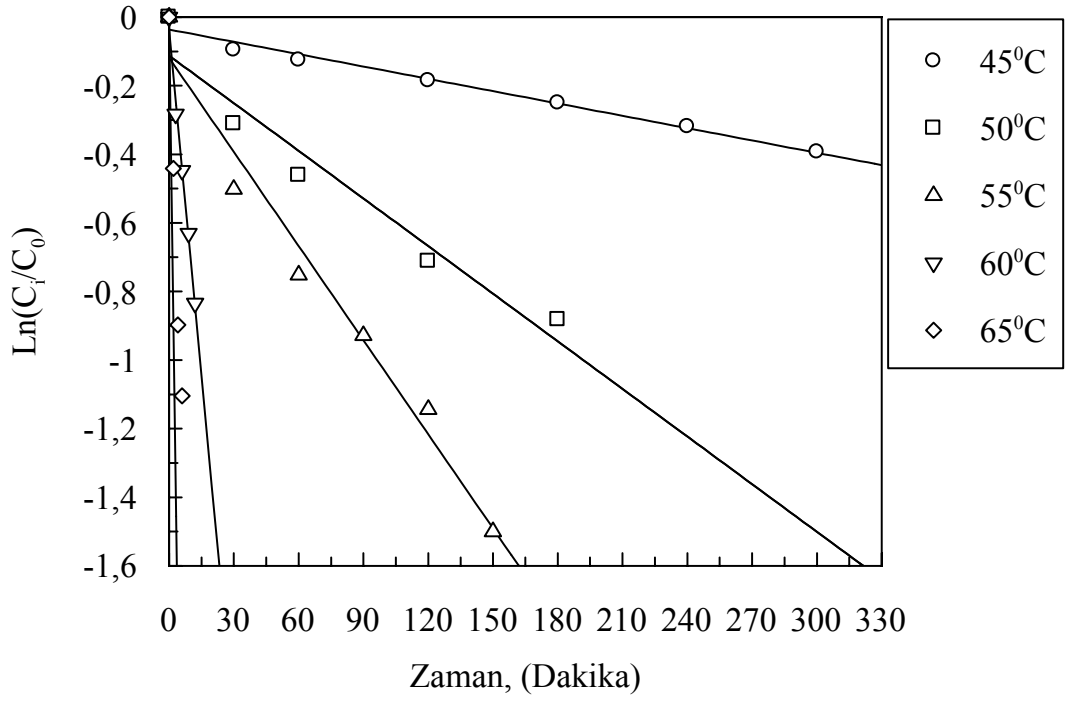
	45°C	**50°C**	**55°C**	**60°C**	**65°C**
β	2.21	1.83	1.93	1.65	1.22
α	0.80	0.86	0.66	0.70	0.83
K_A	0.023	0.019	0.030	-0.022	0.075

4.1.16. 5 mM Cu^{2+} iyonları ilavesinin alkalen proteazın otokatalitik hidrolizi üzerine etkisi

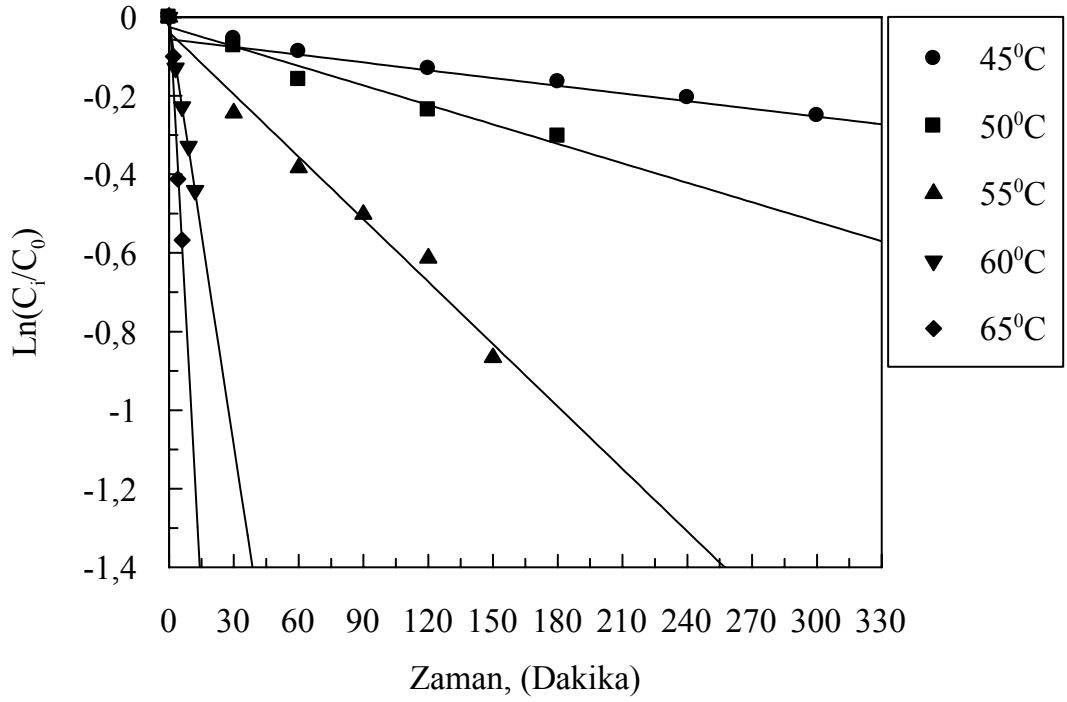
5 mM $CuCl_2$ içeren enzimin ve serbest enzimin 45, 50, 55, 60 ve 65°C'de kendi kendini hidrolizmesi enzim çözeltisindeki protein konsantrasyonundaki azalma izlenerek bölüm 3.3.16'da açıklanan yöntemle izlenmiştir. Her bir sıcaklıktaki otokatalitik hidroliz kinetiğine ilişkin grafikler sırasıyla şekil 4.24 ve 4.25'de verilmiştir. Şekillerdeki lineer doğruların eğiminden serbest ve 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin değişik sıcaklıklardaki otokatalitik hidroliz hız sabitleri belirlenmiş ve sonuçlar tablo 4.25'de verilmiştir.

Tablo 4.25: 5 mM Cu^{2+} iyonları varlığında ve yokluğunda alkalen proteazın sıcaklıklar için otokatalitik hidroliz hız sabitleri (k_i), yarılanma ömürleri ($t_{1/2}$) ve stabilizasyon faktörleri (SF)

Sıcaklık, (°C)	**k_i , (dak^{-1})**		**$t_{1/2}$, (dak)**		**SF**	
	Serbest Enzim	**5mM $CuCl_2$**	**Serbest Enzim**	**5mM $CuCl_2$**	**Serbest Enzim**	**5mM $CuCl_2$**
45	0.00120	0.00077	577.5	900	1	1.56
50	0.00463	0.00165	149.7	420	1	2.81
55	0.00915	0.00530	75.74	130.8	1	1.73
60	0.06719	0.03606	10.31	19.22	1	1.86
65	0.18854	0.10071	3.68	6.88	1	1.87



Şekil 4.24: Serbest enzimin değişik sıcaklıklardaki otokatalitik hidrolizi



Şekil 4.25: 5 mM Cu^{2+} iyonları içeren enzimin değişik sıcaklıklardaki otokatalitik hidrolizi

BÖLÜM 5. TARTIŞMA ve ÖNERİLER

5.1. Alkalen Proteaz Enzimi ve 5 mM $CuCl_2$ İçeren Enzimin Stabilizasyon Çalışmasına Ait Sonuçların Değerlendirilmesi

5.1.1. Alkalen proteaz enzimi ve 5 mM $CuCl_2$'lü enzimin inaktivasyon kinetiklerinin incelenmesi

Literatürde proteazların termal inaktivasyon kinetiklerine ilişkin bazı çalışmalar yayınlanmıştır [61, 62]. *Bacillus clausii* I-52 alkalen proteazının termal inaktivasyonu ile yapılan çalışmada 50 ve 55°C'de enzimin yarı ömür değerleri sırasıyla 6.5 ve 1.5 saat olduğu bildirilmiştir [62]. Bu çalışmada Cu^{2+} iyonları içeren *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının 50 ve 55°C'de yarı ömürleri sırasıyla 6.9 ve 2.4 saat olup *B. clausii* I-52 soyu alkalen proteazınınkinden daha yüksektir. Alkalen proteazın $CuCl_2$ varlığında inaktivasyon kinetikleri ile ilgili çalışmaya ise rastlanmamıştır. *Bacillus polymxa* alkalen proteazının 40°C'de $CuSO_4$ varlığında enzim aktivitesinde kayda değer bir artışa rastlanmadığı belirtilmiştir [63]. Bu çalışmada her bir sıcaklık için alkalen proteaz enzimi ve 5 mM $CuCl_2$'lü enzimin k_i değerleri hesaplanmıştır. Metal iyonu ilave edilmiş enzimin inaktivasyon hız sabitleri serbest alkalen proteaz enzimine göre daha düşük, yarılanma ömürleri ise daha yüksek değerler almıştır. Bu yüksek sıcaklıklarda 5 mM $CuCl_2$'lü enzimin alkalen proteaz üzerindeki stabilizatör etkisini göstermektedir. 5 mM $CuCl_2$'lü alkalen proteazın termal inaktivasyonunun aktivasyon enerjisi serbest alkalen proteaza nazaran daha yüksek bulunmuştur.

5 mM $CuCl_2$'lü alkalen proteaz için K_m değerleri serbest alkalen proteaza göre daha düşük, V_m değerleri ise daha yüksek elde edilmiştir.

5 mM $CuCl_2$'lü alkalen proteazın k_{cat} değerleri doğal alkalen proteaza göre daha yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan 5 mM $CuCl_2$ ilave edilmiş enzimin k_{cat}/K_m oranında bir artma belirlenmiştir. Bu değerler enzimin katalitik performansının Cu^{2+} iyonları ilavesiyle arttığını göstermektedir. Metal iyonu ilavesi enzimin katalitik performasında gelişmeye neden olmuştur. Metal iyonu muhtemelen enzimin substratı olan kazeinin aktif bölgeye bağlanma afinitesini arttırmaktadır. Diğer taraftan K_m değerinin azalması metal iyonlu enzim için enzim-substrat ve enzim-geçiş hali komplekslerinin eşit komplementarite gösterdiklerine işaret eder [55].

K_m değerindeki azalma, bir enzimin substratına olan affinitesinde bir artışa, V_m değerindeki gözlenmiş olan artma ise enzim molekülünün metal iyonu ile bağlanmasının enzimin aktif merkezine uzak bir bölgede olduğunu göstermektedir [64].

5 mM $CuCl_2$'lü alkalen proteaz için aktivasyon serbest enerji (ΔG_i) değerleri doğal alkalen proteaza göre daha yüksek bulunmuştur. Bu değerler alkalen proteazın metal iyonu ile muamele sonrasında termostabilitesindeki artışı gösterir. İnaktivasyon entropisi (ΔS_i) bir sistemde gelişigüzel gerçekleşen değişiklikleri, düzensizlikleri belirtmektedir. 5 mM $CuCl_2$'lü enzim için ΔS_i değerleri doğal enzime göre daha düşük bulunmuştur. Bu ise doğal enzimin metal iyonu ile muamele edildikten sonra konformasyonel yapısının daha kararlı bir hal aldığı ve molekül içi düzensizliklerin azaldığını göstermektedir [65].

Tablo 4.13 ve 4.23'de verilen doğal ve metal iyon ilave edilmiş enzim ile kazein hidrolizi sonuçları termodinamik olarak analiz edildiğinde metal iyonlu enzimin daha az serbest enerjiye ($\Delta G^{\neq}$) gereksinim duyduğu görülür. Buna karşılık metal iyon varlığında enzim için geçiş hali bağlanma enerjisinin ($\Delta G^{\neq}_{E\text{-}T}$) serbest enziminkinden daha yüksek olması geçiş hali stabilizasyonuna ve dolayısıyla metal iyonu ilavesinin daha yüksek katalitik verimliliğe neden olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan metal iyonu varlığında enzimin substrat bağlama serbest enerjisinin ($\Delta G^{\neq}_{E\text{-}S}$) serbest enziminkinden daha düşük olması metal iyonu varlığında enzim-substrat destabilizasyonunun daha düşük olduğunu gösterir. Bu da substrat kazeinin metal

iyonlu enzimin aktif bölgesine doğal enziminkinden daha sağlam bağlandığına işaret eder [55].

45-65°C aralığında 5 mM Cu^{2+} iyonu varlığında enzimin kazein hidrolizi için aktivasyon enerjisi doğal enziminkinden daha yüksek bulunmuştur. Kazein hidrolizi için metal iyonu varlığında enzimin aktivasyon entalpisi ($\Delta H^{\neq}$) ve entropisi ($\Delta S^{\neq}$) yukarıda belirtilen sıcaklık aralığında serbest enziminkinden daha yüksek değerler vermektedir. ($\Delta S^{\neq}$) değerleri arasındaki fark metal iyonu varlığında serbest enzim molekülündeki konformasyon değişikliklerini işaret etmektedir [55].

Enzimler, doğal yapıları stabilize edildikleri zaman daha termostabil olurlar. Hidrojen bağlarını içeren kovalent bağlar, tuz köprüleri ve hidrofobik etkileşimlerin harekete geçmesi ya da proteinin açılma entropisinin azalması ile oluşan stabil yapı daha güçlenir. Bütün bu stabil edici etkileşimler ΔG değerinin normalde olması gereken değerinden fazla bulunmasına neden olur, çünkü entropinin stabiliteyi engelleyici kuvvetleri ona karşı bir denge oluşturmak için azalır [66].

Son yıllarda deterjan endüstrisi, enerji tasarrufu sebebi ile daha düşük sıcaklıklarda aktif olan enzim arayışı içine girmiştir. Kannase adı ile bilinen ve Novo Nordisk tarafından geliştirilen deterjanlarda kullanılan proteaz enziminin 10-20°C'de kararlılık göstermektedir [67]. *B. clausii* GMBAE 42'den elde edilen alkalen proteaz, düşük sıcaklıklarda da yüksek aktivite göstermektedir. Bu nedenle deterjanlara uygun bir enzim olduğu söylenebilir.

Ticari olarak üretilen proteazlar ile *B. clausii* GMBAE 42 tarafından üretilen alkalen serin proteazın özellikleri ile karşılaştırmalı olarak tablo 5.1'de verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi *B. clausii* GMBAE 42'den elde edilen alkalen proteazın özellikleri ticari deterjanlarda katkı maddesi olarak kullanılan ticari enzimlerinki ile benzerlik göstermektedir, bu enzim ticari deterjanlar için iyi bir katkı maddesi olabilir.

Tablo 5.1: *Bacillus clausii* GMBAE 42 proteazının ticari proteazlar ile karşılaştırılması

Ticari Proteaz	Kaynak	Optimum pH	Optimum Sıcaklık	Kaynak
GMBAE 42	*B.clausii*	11.3	60	GMBAE
Alcalase	*B. licheniformis*	7-10	60	Novozymes, Denmark
Savinase	*B. lentus*	8-11	50-60	Novozymes, Denmark
Esperase	*B. lentus*	7-12	50-65	Novozymes, Denmark
Maxatase	*B. subtilis*	9-10	50-60	Gist-brocades, The Netherlands
Opticlean	*B. alcalophilus*	8-11.5	15-60	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Optimase	*B. licheniformis*	7.5-10.5	15-65	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Everlase	Protein Mühendisliği ile geliştirilmiş Savinase	8-11	50	Novozymes, Denmark
Durazyme	Protein Mühendisliği ile geliştirilmiş Savinase	8-11	50	Novozymes, Denmark
Maxapem	Protein Mühendisliği ile geliştirilmiş alkalofilik *Bacillus sp.*	11-12	60	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Profect	*B. lentus* kökenli *Bacillus* sp. expresse edilmiş	10	40-65	Genecor International, Inc., USA

5.2.2. Alkalen proteaz enzimi ve 5 mM $CuCl_2$'lü enzimin otolizinin incelenmesi

5 mM $CuCl_2$ varlığında ve yokluğunda yapılan alkalen proteazın otokatalitik hidroliz çalışmalarında enzimin termal inaktivasyon kinetiğinde elde edilen yarılanma ömürlerine yakın sonuçlar bulunmuştur. Bir proteaz olan kök bromelain (EC 3.4.22.4) ile yapılan çalışmada 50°C'de ilk 60 dakikada çok hızlı otokatalitik hidroliz olduğu bildirilmiştir [68]. *Bacillus clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının ise 50°C'de otokatalitik hızının ilk 60 dakikada daha yavaş olduğu görülmüştür. Sığır pankreatik tripsin (Ti) ve modifiye tripsin ile yapılan çalışmalarda enzimin termal denaturasyonu ve otokatalitik hidrolizine ilişkin kinetik parametreler incelendiğinde, bu enzimlerin 50 ve 60°C'de termal denaturasyon hız sabiti ve otokatalitik hız sabitinin serbest ve 5 mM Cu^{2+} içeren *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazınkinden daha yüksek olduğu görülmüştür [69].

Öneriler :

İleriye yönelik olarak *B. clausii* GMBAE 42 alkalen proteazının farklı pH değerlerinde inaktivasyon kinetiklerinin çalışılması, enzimin farklı katkı maddeleri ile stabilizasyonunun incelenmesi, kimyasal modifikasyonlar ile enzim stabilitesinde ve katalitik performansında olan değişikliklerin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılması enzimoloji literatürüne önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases", ***Microbiology and Molecular Biology Reviews***, vol 62, pp. 597-635, (1998).

2. Kumar, C.G., Takagi, H., "Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint", ***Biotechnology Advences***, vol. 17, pp. 561-594, (1999).

3. Anwar, A., Saleemuddin, M., "Alkaline Proteases: A Review", ***Bioresource Technology***, vol. 64, pp. 175-183, (1998).

4. Wiseman, A., "The Application of Enzymes in Industry", ***Handbook of Enzyme Biotechnology***, Second edition, Chapter 3, pp. 274-373, (1987).

5. Denizci, A.A., Kazan, D., Abeln, E.C.A., Erarslan, A., "Newly İsolated *Bacillus Clausii* GMBAE 42: An Alkaline Protease Producer Capable to Grow Under Higly Alkaline Conditions", ***Journal of Applied Microbiology***, vol. 96, pp. 320-327, (2004).

6. Maurer, Karl-Heinz, "Detergent Proteases", ***Current Opinion in Biotechnology***, vol. 15, pp. 330-334, (2004).

7. Phadatare, S.U., Srinivasan, M.C., Deshpande, V.V., "High Activity Alkaline Protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme Production and Compatibility with Commertial Detergents", ***Enzyme and Microbial Technology***, vol. 15, pp. 72-76, (1993).

8. Jasvir, S., Navdeep, G., Devasahayam, G., Sahoo, D.K., "Studies on Alkaline Protease Produced by *Bacillus* sp. NG312", ***Applied Biochemistry and Biotechnology,*** vol. 76, pp. 57-63, (1999).

9. Abdel-Naby, M., Ismail, A-M.S., Ahmed, S.A., Abdel Fattah, A.F., "Production and İmmobilization of Alkaline Protease from *Bacillus mycoides*", ***Bioresource Technology***., vol. 64, pp. 205-210, (1998).

10. Macbrouk, S.S., Hashem, A.M., El-Shayeb N.M.A., Ismail, A.S., Abdel-Fattah A.F., "Optimization of Alkaline Protease Productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415", ***Bioresource Technology***, vol. 69, pp. 155-159, (1999).

11. Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R., Darmwal, N.S., "The Production of Alkaline Protease by *Bacillus* Species İsolate", ***Bioresource Technology,*** vol. 67, pp. 201-203, (1999).

12. Johnvesly, B., Naik, G.R., "Studies on Production of Thermostable Alkaline Protease from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus sp.,* JB-99 in a Chemically Defined Medium", ***Process Biochemistry***, vol. 37, pp. 139-144, (2001).

13. Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., Hoodal, G.S., "Enhanced Production and Characterization of an Highly Thermostable Alkaline Protease rom *Bacillus* sp. P-2.", ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, vol. 17, pp. 125-129, (2001).

14. Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K., Gupta, R., "Characterization and Wash Performance of an SDS-Stable Alkaline Protease from *Bacillus sp.*", ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, vol. 17, pp. 493-497, (2001).

15. Singh, J., Vohra, R.M., Sahoo, D.K., "Purification and Characterization of Two Extracellular Alkaline Protease from a Newly İsolated Obligate Alkalophilic *Bacillus sphaericus*", ***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology***, vol. 26, pp. 387-393, (2001).

16. Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H., Zhang, Y., "Purification and Characterization of an Alkaline Serine Protease from Dehairing Function from *Bacillus pumilus*", ***Current Microbiology***, vol. 46, pp. 169-173, (2003).

17. Rahman, Abd.R.N.Z., Razak C.N., Ampon, K., Basri, M., Yunus, W.Md.Z.W., Salleh, A.B., "Purification and Characterization of a Heat-Stable Alkaline Protease from *Bacillus stearothermophilus F1*", ***Applied Microbiology and Biotechnol*ogy**, vol. 40, pp. 822-827, (1994).

18. 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***., vol. 35, pp. 213-219, (1999).

19. Saeki, K., Hitomi, J., Okuda, M., Hatada, Y., Kageyama, Y., Takaiwa, M., Kubota, H., Hagihara, H., Kobayashi, T., Kawai, S., Ito, S., "A Novel Species of Alkaliphilic *Bacillus* that Produced an Oxidatively Stable Alkaline Serine Protease", ***Extremophiles***, vol. 6, pp. 65-72, (2002).

20. Takami, H. and Horikoshi, K., "Analyses of The Genome of Alkaliphilic *Bacillus* Strains from an İndustrial Point of View", ***Extremophiles***, vol. 4, pp. 99-108, (2000).

21. Takami, H. and Krulwich, T.A., "Reidentification of Facultatively Alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 as *Bacillus pseudofirmus* OF4", ***Extremophiles***, vol. 4, pp. 19-22, (2000).

22. Takami, H., Nogi, Y. and Horikoshi, K., "Reidentification of The Keratinase Producing Facultatively Alkaliphilic *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans*", ***Extremophiles***, vol. 3, pp. 293-296, (1999).

23. Yumoto, I., Yamazaki, K., Sawabe, T., Nakano, K., Kawasaki, K., Ezura, Y. and Shinano, H., "*Bacillus hortii* sp.nov: a Gram-Negative Alkaliphilic *Bacillus*", ***International Journal of Systematic Bacteriology***, vol. 48, pp. 565-571, (1998).

24. Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, T.H., "Oxygen Transfer Effects in Serine Alkaline Protease Fermantation by *Bacillus licheniformis*: Use The Citric Acid as The Carbon Source", ***Enzyme Microbial Technology***, vol. 23, pp. 451-461, (1998).

25. Çalık, P., Çalık, G., Tokaç, S., Özdamar, T.H., "Metabolic Flux Analyses for Serine Alkaline Protease by *Bacillus licheniformis* in a Defined Medium: Effects of The Oxygen Transfer Rate", ***Biotechnology and Bioengineering***, vol. 64, pp. 151-167, (1999).

26. Çalık, P., Özdamar, T.H., "Mass Flux Balance Based Model and Metabolic Pathway Engineering Analysis for Serine Alkaline Protease Synthesis by *Bacillus licheniformis*", ***Enzyme Microbial Technology***, vol. 24, pp. 621-635, (1999).

27. Çalık, P., Tokaç, S., Çalık, G., Özdamar, T. H., "Serine Alkaline Protease Over Production Capacity of *Bacillus licheniformis*", ***Enzyme Microbial Technology***, vol. 26, pp. 45-60, (2000).

28. Çalık, P., Özdamar, T.H., "Metabolic Flux Analyses for Serine Alkaline Protease Production", ***Enzyme Microbial Technology***, vol. 27, pp. 793-805, (2000).

29. Çalık, P., Çalık, G., Özdamar, T.H., "Oxygen Transfer Strategy and Its Regulation Effects in Serine Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis*", ***Biotechnology and Bioengineering***, vol. 69, pp. 301-311, (2000c).

30. Çalık, P., Özdamar, T.H., "Carbon Sources Affects Metabolic Capacities of *Bacillus* Species for The Production of Industrial Enzymes: Theoretical Analyses for Serine and Neutral Protease and α-Amylase", ***Biochemical Enginering Journal***, vol. 8, pp. 61-81, (2001).

31. Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R., Darmwall, N.S., "The Production of Alkaline Protease by a *Bacillus* Species Isolate", ***Bioresource Technology***, vol. 67, pp. 201-203, (1999).

32. John, F.K., "Enzyme Technology" (H.J. REHM., G. REED editör), ***Biotechnology***, vol. 7A, pp. 37-62, (1987)

33. Nelson, D.L., Cox, M.M., "Principles of Biochemistry", Fourth edition, ***W. H. Freeman and Company***, New York, 192, (2005).

34. Aoki, K., Miyamato, K., Murakami, S., Shinke, R., "Anaerobic Synthesis of Extracellular Proteases by The Soil Bacterium *Bacillus* sp. AM-23: Purification and Characterization of The Enzymes", ***Soil Biology and Biochemistry***, vol. 27, no. 11, pp. 1377-1382, (1995).

35. *Specifity of ser-protease family* [online], http://juang.bst.ntu.edu.tw/files/Enz09%20specificity.PPT , **(Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006)**.

36. *Enzyme catalysis and Serine Proteinases* [online], http://www-biology.ucsd.edu/clases/bibc100.SP06/LectureSM.pdf, **(Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006)**.

37. Dr. Jessica Bell, Davies Laboratory, NIDDK/NIH, for the University of Richmond, *Proteases* [online], http://www.richmond.edu/~bell2/protease_biochem.march05.ppt, **(Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006)**.

38. *Papaya Ekstresi* [online], http://www.bitkisel-tedavi.com/papaya, **(Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006)**.

39. *Bromelain - Wikipedia, the free encyclopedia* [online], http://en.wikipedia.org/wiki/Bromelain, **(Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006)**.

40. *Bromelain – Ananas* [online], http://www.bitkisel-tedavi.com/bromelain, **(Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006)**.

41. *Immobilized ficin*, [online], http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=7FC18EC5-57E3-4565-9DCD, **(Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006)**.

42. *Trypsin - Wikipedia, the free encyclopedia* [online], http://en.wikipedia.org/wiki/Trypsin, **(Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006)**.

43. *İmage galery bovine trypsine* [online], http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/Images/tyrpsine.jpeg, **(Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006).**

44. *Classification of proteases* [online], http://www.biology.ucsd.edu/classes/old.web.classes/bibc100.WI03/pdf/3-6.pdf, **(Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006).**

45. *Pepsin - Wikipedia, the free encyclopedia* [online], http://en.wikipedia.org/wiki/Pepsin, **(Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006)**.

46. *Rennet - Wikipedia, the free encyclopedia* [online], http://en.wikipedia.org/wiki/Rennet, **(Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006)**.

47. *Chapter 7 Bioproses and product development* [online], http://dbtindia.nic.in/anualreports/2002-3/chapter7.pdf, **(Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2006)**.

48. Babe, L.M., and Craik C.S., "Viral Proteases: Evolution of Diverse Structural Motifs to Optimize Function", ***Cell***, vol. 91, pp. 427-430, (1997).

49. Moreira, K.A., Albuquerque, B.F., Teixeira, M.F.S., Porto, A.L.F., Lima, F.J.L., "Application of Protease from *Nocordiopsis* sp. as a Laundry Detergent Additive", ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, vol.18, pp.309-315, (2002).

50. Grufferty, M.B. and Fox, P.F., "Milk Alkaline Proteinase: A Review**.", J*ournal Dairy Research***, vol. *55*, pp. 609-630, (1988).

51. Bastian, E.D. and Brown, R.J., "Plasmin in Milk and Dairy Products: an Update", ***Inernational. Dairy Journal***, vol.6, pp. 435-457, (1996).

52. Kazan, D., Denizci, A.A., Öner, K.M.N., Erarslan, A., "Purification and Characterization of a Serin Alkaline Protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42.", ***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology***, vol. 32, pp. 335-344, (2005).

53. Segel, J.H., "Enzyme Kinetics", ***John Wiley and Sons***, New York, (1975).

54. Erarslan, A., Koçer, H., "Thermal Inactivation Kinetics of Penicilin G acylase Obtained from a Mutant Derivative of *Escherichia coli* ATTC 11105", ***Journal of Chemical Technology and Biotechnology***, pp. 55-79, (1992).

55. Siddiqui, K.S., Saqip, A.A.N., Rashid, M.H., and Rojaka, M.I., "Carboxyl Group Modification Significantly Altered The Kinetic Properties of Purified Carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger*", ***Enzyme and Microbial Technology***, vol. 27, pp. 467-474, (2000).

56. Erarslan A.A., "Enzim Kinetiği Notları", ***TÜBİTAK-GMBAE***, pp., 69-71, (2004).

57. *Tanımlayıcı ölçüler* [online], http://www.odevsitesi.com., **(Ziyaret tarihi : 15 Kasım 2006)**.

58. Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K., "Production of Extremely Thermo stable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. No. AH-101", ***Applied Microbiology and Biotechnology,*** vol. 30, pp. 120-124, (1989).

59. Spector, T., "Refinement of The Coomasie Blue Method of Protein Quantitation", ***Analytical Biochemistry***, vol. 86, pp.142-146, (1978).

60. Sedmak, J.J., Grossberg, S.E., "A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Protein Using Comassie Brilliant Blue G250", ***Analytical Biochemistry***, vol.79, pp. 544-552, (1977).

61. Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K., "Production of Extremely Thermo stable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. No. AH-101", ***Applied Microbiology and Biotechnology,*** vol. 30, pp. 120-124, (1989).

62. Owusu, K.R.,& Doble, C., "Heat-stability of a Proteinase from Physchotrophic *Pseudomonas fluorescens* P38, Chymotrypsine and Thermolysin", ***Food Chemistry***, vol. 51, pp. 137-142, (1994).

63. Joo, H.S., Koo, Y.M., Choi, J.W., Chang, C.S., "Stabilization Method of an Alkaline Protease from Inactivation by Heat, SDS and Hydrogen Peroxide", ***Enzyme and Microbial Technology***, vol. 36, pp. 766-772, (2005).

64. Kazan D., Ertan H., Erarslan A., "Stabilization of *Escherichia coli* Penicilin G Acylase Against Thermal Inactivation by Cross-linking with Dextran Dialdehyde Polymers", ***Appl. Microbiol. Biotechnology***, vol. 48, pp. 191-197, (1997).

65. Solomons, G., Fryhle, G.,"Organik Kimya", 7. Basımdan Çeviri, ***Literatür Yayıncılık***, 111-112, (2002).

66. Daniel, R.M., "The Upper Limits of Enzyme Thermal Stability", ***Enzyme and Microbial Technol***., vol. 19, pp. 74-79, (1996).

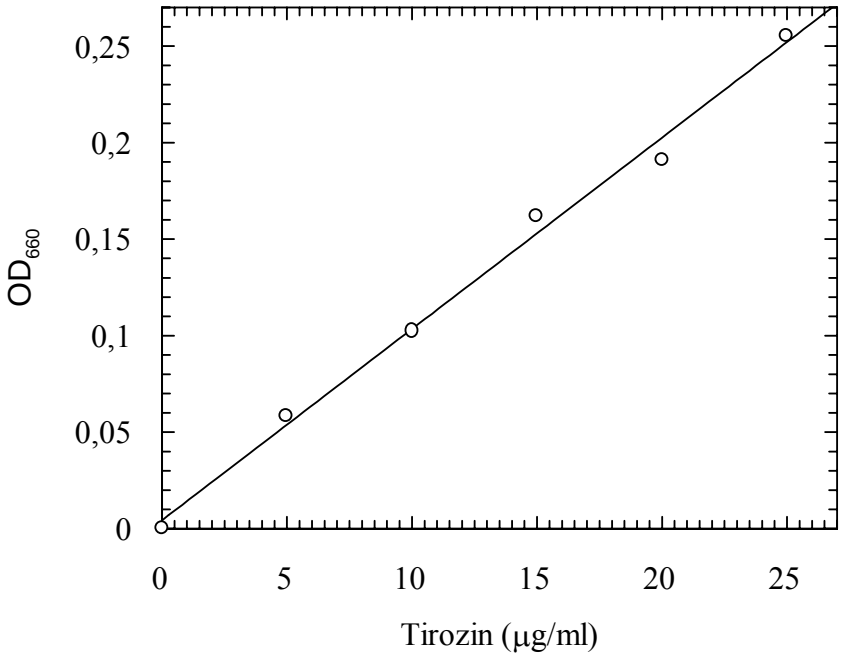
67. Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., "Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications", ***Applied Microbiology and Biotechnology***, vol. 59, pp. 15-32, (2002).

68. Bickerstaff, G.F., and Zhou, H., "Protease Activity and Autodigestion (Autolysis) Assays Using Coomassie Blue Dye Binding", ***Analytical Biochemistry***, vol. 210, pp. 155-158, (1993).

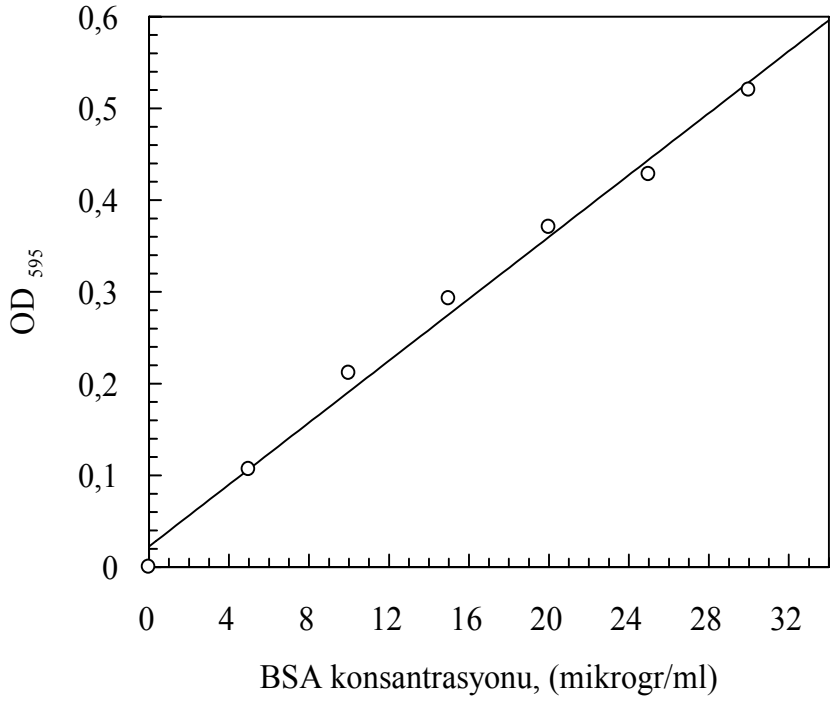
69. He, Z., Zhang Z., He, M., "Kinetik Study of Thermal Inactivation for Native and Methixypolyethylene Glycol Modified Trypsin", ***Process Biochemistry***, vol.35, pp. 1235-1240, (2000).

EKLER

Ek A. Alkalen Proteaz Aktivitesi ve Protein Miktarı Tayini İçin Standart Grafikleri



Şekil A.1: Tirozin standart eğrisi (Korelasyon Katsayısı: 0.9969)



Şekil A.2: Protein standart eğrisi (Korelasyon Katsayısı: (r) = 0.9959)

Ek B. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

Çözelti 1. 1 M Sodyum Sesquikarbonat tampon (pH 10.5)

$NaHCO_3$	4.2 gr
Na_2CO3	5.3 gr

Ortam içerikleri 100 ml distile suda çözüldükten sonra, 121ºC'de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. pH 10.5'e ayarlamak için besiyerlerine %1 oranında ilave edilmiştir.

Çözelti 2. 50 mM Glisin-NaOH tampon (pH 10.5)

Glisin	3.75 gr
NaOH	2 gr

1 L distile suda, glisin ve sodyum hidroksit ayrı ayrı çözülmüş ve bu iki çözelti pH 10.5 olana dek birbiriyle karıştırılmıştır.

Çözelti 3. 50 mM Glisin-NaOH-NaCl tampon (pH 10.5)

Glisin	3.75 gr
NaOH	2 gr
NaCl	2.925 gr

1 L distile suda, glisin ve sodyum hidroksit ayrı ayrı çözülmüş ve bu iki çözelti pH 10.5 olana dek birbiriyle karıştırılmıştır. Bu karışıma 2.925 gr NaCl ilave edilmiştir.

Çözelti 4. Kazein çözeltisi

50 mM Glisin-NaOH-NaCl tampon çözeltisinin 100 ml'sinde 0.6 gr olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır.

Çözelti 5. Trikloroasetikasit çözeltisi

0.11 M TCA	17.97 gr
0.22 M Sodyum asetat	18.05 gr
0.33 M Asetik asit	18.87 ml

Ortam içerikleri 1 L distile suda çözülülür.

Çözelti 6. Sodyum karbonat çözeltisi (0.5 M)

52.995 gr Na_2CO_3 (sodyum karbonat) 1 L distile suda çözülmüştür.

Çözelti 7. Folin-Ciocalteau reaktifi (yarı yarıya seyreltilmiş)

100 ml Folin-Ciocalteu fenol, 100 ml distile suda seyreltilir.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İzmir'de doğdu. İlkokulu İzmir'de, ortaokulu Gölcük'te okudu. 1998 yılında Gölcük Barbaros Hayrettin Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandı. 2003 yılında bu bölümden mezun oldu. Mezun olduğu yıl Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Kimya anabilim dalında yüksek lisans programına başladı. 31/12/2004 - 14/10/2006 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. 15/10/2006 tarihinde TÜBİTAK-MAM-GMBE Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı'nda Araştırmacı olarak göreve başladı. Halen bu görevini sürdürmektedir.